

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik und dem
Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktoren: Prof. Dr. med. M. Dieterich, FANA, FEAN

Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Brandt, FRCP, FANA

Charakterisierung neuronaler Populationen des humanen Ganglion Trigeminale und deren Assoziation mit der latenten Herpes Simplex Virus Typ 1 Infektion

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Desiree Zörgiebel-Wick, geb. Wick

aus Singen (Hohentwiel)

2018

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD. Dr. med. Katharina Hübner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heiko Adler
PD Dr. Beate Averbeck
PD Dr. Florence Bareyre
Prof. Dr. Dr. Thomas Brandt

Mitbetreuung durch die Dr. phil. Sarah Flowerdew
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Susanne Himmelein

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 05. 2018

Für meine Liebsten



Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Herpes Simplex Virus Typ 1	1
1.1.1	Die Familie der Herpesviridae	1
1.1.2	Struktur des HSV-1	4
1.1.3	Epidemiologie und Übertragung des HSV-1	4
1.1.4	Klinische Bedeutung der HSV-1 Infektion.....	5
1.1.5	Lytische Infektion und Replikation	6
1.1.6	Latente Infektion des HSV-1	8
1.1.7	Einfluss von Wirtsfaktoren auf die HSV-1 Latenz	10
1.1.7.1	Die Rolle des Immunsystems bei der HSV-1 Latenz.....	10
1.1.7.2	Die Rolle des Neurons bei der HSV-1 Latenz	11
1.2	Neuronale Populationen und ihre Marker.....	13
1.2.1	Genereller Aufbau sensorischer Ganglien.....	13
1.2.2	Die <i>glial cell line-derived neurotrophic factor-</i>	14
	<i>Family Ligand</i> Rezeptor Tyrosin Kinase RET	14
1.2.3	Die <i>nerve growth factor</i> Rezeptor Tyrosin Kinase A TrkA.....	16
1.2.4	Die neuronale Stickstoffmonoxid Synthase nNOS.....	17
1.3	Ziel der Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Auflistung der Geräte	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3	Chemikalien	21
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	22
2.1.5	Sonden und Nukleotide	23
2.1.6	Antikörper und Seren	24
2.1.7	Biologisches Material	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Verarbeitung des biologischen Materials.....	26
2.2.1.1	Gewebebegewinnung und Gewebepvorbereitung	26
2.2.1.2	Herstellung von Gefrierschnitten.....	26
2.2.2	Immunhistochemie der Marker RET, TrkA und nNOS	27
2.2.3	Doppelfärbung aus <i>in situ</i> Hybridisierung und Immunhistochemie.....	29
2.2.3.1	Erster Teil: <i>in situ</i> Hybridisierung zum Nachweis von LAT	29

2.2.3.2 Zweiter Teil: Immunhistochemie der neuronalen Marker.....	31
2.2.4 Quantifizierungen der neuronalen Populationen.....	32
2.2.5 Größenbestimmung der Neurone.....	32
2.2.6 Statistik	35
3 ERGEBNISSE.....	36
3.1 Untersuchtes Gewebe	36
3.2 Nachweis der neuronalen Marker durch Immunhistochemie.....	37
3.3 LAT Nachweis durch <i>in situ</i> Hybridisierung	39
3.4 Doppelfärbungen aus Immunhistochemie und <i>in situ</i> Hybridisierung	40
3.5 Quantitative Charakterisierung neuronaler Populationen	44
3.5.1 Verteilung der neuronalen Marker im humanen.....	44
Ganglion trigeminale	44
3.5.2 Quantitative Bestimmung der LAT+ Neurone	44
3.5.3 Quantitativer Zusammenhang aus Marker und LAT	45
3.6 Charakterisierung der Größenverhältnisse.....	49
3.6.1 Größenverhältnisse der neuronalen Populationen.....	49
3.6.2 Größenverhältnisse der LAT+ und LAT- Neurone	52
4 DISKUSSION.....	54
5 ZUSAMMENFASSUNG	62
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	64
7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	70
8 TABELLENVERZEICHNIS	71
9 PUBLIKATIONEN.....	72
10 LITERATURVERZEICHNIS	73
11 DANKSAGUNG	82

1 EINLEITUNG

1.1 Herpes Simplex Virus Typ 1

1.1.1 Die Familie der Herpesviridae

Die Familie der Herpesviren stellt eine Gruppe von über 100 Viren dar, von denen acht humanpathogen sind. Die Bezeichnung leitet sich von dem griechischen Wort „kriechen“ ab. Dies bezieht sich auf die Art der Ausbreitung des Herpes Simplex Virus auf der Haut. Die Herpesviren zeichnen sich zum einen durch eine einheitliche morphologische Struktur (ikosaedrisch umhüllte DNA Viren) aus. Zum anderen haben sie die Fähigkeit, nach der Primärinfektion in einen latenten Zustand überzugehen, aus dem sie unter gewissen Umständen reaktivieren können (lytische Infektion) (Wagner and Bloom 1997; Modrow S. 2003).

Die Einteilung erfolgt in α -, β - und γ -Herpesviren. Die α -Herpesviren, zu denen das Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1), das Herpes Simplex Virus Typ 2 (HSV-2), und das Varizella Zoster Virus (VZV) gehören, charakterisieren sich dadurch, dass sie schnell replizieren, ein breites Wirtsspektrum aufweisen und eine lebenslange Latenz in Neuronen etablieren können (Wagner and Bloom 1997).

Zu den β -Herpesviren zählen das Cytomegalovirus (CMV) und die humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV 6 und 7). Das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das humane Herpesvirus 8 (HHV8) gehören zu den γ -Herpesviren (Modrow S. 2003). Die β - und γ -Herpesviren unterscheiden sich zwar hinsichtlich der Größe ihres Genoms, haben allerdings gemeinsam, dass sie einen relativ langen Vermehrungszyklus haben und ein engeres Wirtsspektrum besitzen (Wagner and Bloom 1997). Nahezu 100% der Bevölkerung zeigt eine Infektion mit mindestens einem der acht humanpathogenen Herpesviren (Grinde 2013).

Da das HSV-1 Gegenstand dieser Arbeit ist, wird es im weiteren Verlauf näher charakterisiert werden.

Das HSV-2 wird normalerweise beim Geschlechtsverkehr übertragen, somit können in der Regel erst ab einem gewissen Alter Antikörper gegen HSV-2 nachgewiesen werden. Es gibt einen direkten Zusammenhang mit der Anzahl der wechselnden Geschlechtspartner und dem Erwerb von HSV-2. Während das HSV-1 seine Latenz normalerweise im Ganglion trigeminale etabliert, ist das HSV-2 in sakralen Ganglien nachzuweisen (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998). Mittlerweile scheint die Mehrheit der genitalen Herpesinfektionen jedoch durch HSV-1 bedingt zu sein (Grinde 2013). Bei der Primärinfektion von HSV-2 zeigen sich erst Makulae und Papulae, die

sich im Verlauf zu Vesikeln und Ulzerationen im Genitalbereich entwickeln (Corey et al. 1983; Corey 1982). Zusätzlich kann es zu Fieber, Dysurie und inguinaler Lymphadenopathie kommen. Zu den Komplikationen der HSV-2 Infektion zählen die sakrale Radikulomyelitis, die Neuralgie und die Meningoenzephalitis (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998).

Die Primärinfektion des VZV führt zu Windpocken, während die Reaktivierung, zu einem späteren Zeitpunkt im Leben, zu der Erkrankung Herpes Zoster, auch Gürtelrose genannt, führt. Die Symptomatik beschränkt sich hier meist auf ein bis drei Dermatome (Gilden, Cohrs, and Mahalingam 2003; Grinde 2013).

EBV und CMV zeigen ein sich ähnelndes klinisches Bild. EBV führt besonders im Jugendalter zur infektiösen Mononukleose („kissing disease“ oder Pfeiffersches Drüsenfieber), die sich durch Fieber, geschwollene Lymphknoten und Fatigue auszeichnet (Grinde 2013). Das Virus ist außerdem mit Malignomen assoziiert. Hier zu nennen sind das Burkitt- und das Hodgkin-Lymphom sowie das Nasopharynxkarzinom (Modrow S. 2003). Bei immungeschwächten Patienten steht das EBV in Assoziation mit der oralen Haarleukoplakie (Ryder et al. 2012).

Die kongenitale Infektion mit CMV stellt eine der Hauptursachen für virale Geburtsschäden dar (Townsend et al. 2013). Außerdem kann es im Rahmen einer Immunsuppression zu generalisierten, lebensbedrohlichen Verläufen kommen. Zu nennen sind hier vor allem die durch CMV bedingten Pneumonien (Modrow S. 2003).

Die HHV 6 und 7 führen vor allem bei Kindern unter 2 Jahren zu der Erkrankung Exanthema subitum (Roseola infantum oder Drei-Tage-Fieber). Eine Vielzahl der Kinder im Alter von 4 Jahren trägt das Virus in sich. Jedoch werden nur 30% symptomatisch (Zerr et al. 2005).

Das HHV 8 ist mit dem Kaposi Sarkom assoziiert, das vor allem bei AIDS Patienten beobachtet wurde (Boshoff and Weiss 2002).

Eine Übersicht der Einteilung der humanen Herpesviren mit den jeweiligen charakteristischen Eigenschaften und klinischen Bedeutungen stellt Tabelle 1 dar.

Tabelle 1: Einteilung und Charakteristika der humanpathogenen Herpesviren.

Subfamilie	Genus	Name des humanpathogenen Virus	Klinische Bedeutung	Ziel bei Primärinfektion	Ort der Latenz
Alpha	Simplex-virus	Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) / Humanes Herpesvirus 1 (HHV1)	<ul style="list-style-type: none"> - Herpes labialis - Genitale Ulzera - Keratokonjunktivitis - Enzephalitis - Meningitis - Neuritis vestibularis - Hörsturz - Fazialisparese (<i>Bell's palsy</i>) 	muco-epithelial	Neurone der Sensorischen Ganglien
Alpha	Simplex-virus	Herpes Simplex Virus Typ 2 (HSV-2) / Humanes Herpesvirus 2 (HHV2)	<ul style="list-style-type: none"> - Herpes labialis - Genitale Ulzera 	muco-epithelial	Neurone der Sensorischen Ganglien
Alpha	Varicello-virus	Varizella Zoster Virus (VZV) / Humanes Herpesvirus 3 (HHV3)	<ul style="list-style-type: none"> - Windpocken - Herpes Zoster 	muco-epithelial	Neurone der Sensorischen Ganglien
Beta	Cytomegalovirus	Humanes Cytomegalovirus (CMV) / Humanes Herpesvirus 5 (HHV5)	<ul style="list-style-type: none"> - Mononukleose - Pneumonien bei Immunsuppression 	Monozyten Lymphozyten Epithelien	Monozyten Lymphozyten
Beta	Roseolo-virus	Humanes Herpesvirus 6 (6A u. 6B) (HHV6)	- Roseola infantum (Exanthema subitum)	T-Lymphozyten	T-Lymphozyten
Beta	Roseolo-virus	Humanes Herpesvirus 7 (HHV7)	- Roseola infantum (Exanthema subitum)	T-Lymphozyten	T-Lymphozyten
Gamma	Lympho-cryptovirus	Epstein-Barr-Virus (EBV) / Humanes Herpesvirus 4 (HHV4)	<ul style="list-style-type: none"> - Mononukleose - Burkitt-Lymphom - Hodgkin-Lymphom - Haarleukoplakie - Parodontitis - Nasopharynxkarzinom 	B-Lymphozyten Epithelien	B-Lymphozyten

Gamma	Rhadinovirus	Kaposi Sarkom assoziiertes Virus / Humanes Herpesvirus 8 (HHV8)	- Kaposi Sarkom - <i>body-cavity-based</i> Lymphome	B- und T-Lymphozyten Epithelien	B-Lymphozyten T-Lymphozyten
--------------	--------------	--	--	------------------------------------	--------------------------------

(Tabelle zusammengestellt aus (Modrow S. 2003) und (Grinde 2013)).

1.1.2 Struktur des HSV-1

Der Durchmesser der Virionen beträgt 150 bis 200 nm. Das Virus zählt mehr als 30 Strukturproteine. Vier Komponenten (1-4) bestimmen den Aufbau des Herpesvirus: Die doppelsträngige, lineare DNA des Virus (1), die aus mindestens 152 Kilobasen (kb) besteht und sich im Kern befindet, ist mit dem Virus-Core, einer fibrillären Proteinmatrix assoziiert (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998; Modrow S. 2003). Dieser Komplex wird von dem sogenannten Kapsid (2) umgeben. Das Kapsid bildet eine ikosaedrische Form und besteht aus 162 Einzelbausteinen, den Kapsomeren. Das Tegument (3), das aus amorph angeordneten Proteinen besteht, umgibt dieses Nukleokapsid (1 und 2). Schließlich besitzt das Virus eine Virushülle (4). Diese umgibt die Kapsid-Tegument Struktur und wird aus mindestens 10 glykosylierten und mehreren unglykosylierten viralen Proteinen, Lipiden und Polyaminen, gebildet (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998).

1.1.3 Epidemiologie und Übertragung des HSV-1

Das HSV-1 ist ein ubiquitär vorkommendes humanes Pathogen (Umene and Sakaoka 1999). Das Virus kann weltweit verzeichnet werden, sowohl in Industrie- als auch in Entwicklungsländern. Eine Infektion von Tier auf Mensch konnte nicht nachgewiesen werden, somit ist der Mensch der einzige natürliche Wirt. Die Weitergabe des Virus erfolgt im engen körperlichen Kontakt. Die Primärinfektion setzt Schleimhautkontakt bzw. Kontakt mit geschädigter Haut voraus. Durch die bei der Infektion entstehenden Bläschen, die eine hohe Anzahl an infektiösen Virionen enthalten, verfügt das Virus über einen Mechanismus der die Transmission erleichtert (Grinde 2013; Modrow S. 2003).

Die Inzidenz ist abhängig von der geographischen Lage, dem sozioökonomischen Status und dem Alter. Somit erfolgt in Entwicklungsländern zu einem früheren Zeitpunkt eine Serokonversion, ebenso bei benachteiligtem Sozialstatus (Whitley,

Kimberlin, and Roizman 1998). Eine weltweit durchgeführte Studie zeigte, dass in den meisten Ländern ein Anstieg der HSV-1 Prävalenz mit zunehmendem Alter bzw. eine Plateaubildung nach dem 30. Lebensjahr zu verzeichnen ist. Die Transmission erfolgt am häufigsten im Kindes- und Jugendalter (Smith and Robinson 2002). In Deutschland waren Kleinkinder im Alter von 1-5 Jahren in 31% seropositiv. Bei 6- bis 16-jährigen Personen waren 44%-49% HSV-1 positiv. Erwachsene zwischen 20 und 49 Jahren zeigten sich in 82% seropositiv, während Personen mit über 70 Jahren in über 90% seropositiv waren (Wutzler et al. 2000).

Zu den begünstigenden Faktoren der Reaktivierung zählen sowohl physischer als auch psychischer Stress. Zudem Fieber, Hautreizungen durch starke Sonneneinstrahlung, anderweitige Gewebeschädigungen, sowie Zustände, die mit einer Immunsuppression einhergehen (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998; Chida and Mao 2009). Auch wenn eine Infektion mit HSV-1 lebensbedrohlich verlaufen kann, wie beispielsweise bei der HSV Enzephalitis, ist eine sachtere Interaktion zwischen Virus und Wirt durch Etablierung der Latenz und gelegentliche Reaktivierung häufiger (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998).

1.1.4 Klinische Bedeutung der HSV-1 Infektion

Klinisch ist die Primärinfektion von der Reaktivierung zu unterscheiden.

Bei den Schleimhaut-assoziierten Erkrankungen gibt es bei der Primärinfektion unterschiedliche Verläufe. Ein asymptomatischer Verlauf ist häufig. Die Inkubationszeit beträgt sechs bis acht Tage (Modrow S. 2003). Besonders im Kindesalter kann es zu einer symptomatischen, schmerzhaften Erkrankung mit Beteiligung der gingivalen und bukkalen Mukosa kommen (Gingivostomatitis herpetica). Die Läsionen stellen sich von Bläschen bis hin zu oberflächlichen Schleimhautulzera auf erythematösem Grund dar. Eine submandibuläre Lymphadenopathie kann auftreten.

Des Weiteren ist die neonatale Form der HSV-1 Infektion zu nennen. Die Infektion erfolgt hier entweder in utero, intrapartum durch Kontakt zu infizierter Schleimhaut des Genitalbereichs der Mutter oder postpartum durch Kontakt zu Personen mit z.B. Herpes labialis. Die neonatale Infektion verläuft häufig symptomatisch und nicht selten letal (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998).

Als *herpetic whitlow* wird die Manifestation des HSV-1 am Finger bezeichnet, was besonders bei zahnmedizinischem Personal auftritt (Clark 2003; Lewis 2004).

Abzugrenzen sind Erkrankungen, die meist bei einer Reaktivierung, zu einem späteren Zeitpunkt im Leben, auftreten. Das HSV-1 führt dabei vorwiegend zu Erkrankungen im oro-fazialen Bereich (Modrow S. 2003). Beim Herpes labialis zeigen sich häufig

Prodromi wie Schmerzen, Kribbeln, Brennen oder Jucken im Bereich der Lippen, gefolgt von Bläschenbildung. Die vesikulären Läsionen wandeln sich in pustuläre, ulzerierende und dann krustige Gebilde um, um dann nach ca. 8-10 Tagen abzuheilen. Bei Patienten mit atopischer Dermatitis kann sich HSV-1 als generalisiertes Ekzema herpeticum äußern (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998).

Auch am Auge kann es zu einer Reaktivierung von HSV-1 kommen. Die HSV Keratokonjunktivitis kann unilateral oder bilateral auftreten. Pathognomonisch sind bei der Keratitis dendritica die baumartig verzweigten Läsionen der Hornhaut. In schweren Fällen kann es zu geographischen Ulcera kommen (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998). Die HSV Infektion der Augen stellt die Hauptursache für Erblindung in Entwicklungsländern dar (Farooq and Shukla 2012).

Des Weiteren kann es bei einer Reaktivierung zu Erkrankungen wie Gesichtslähmung (Fazialisparese bzw. *Bell's Palsy*) und Neuritis vestibularis kommen (Steiner and Kennedy 1995; Steiner, Kennedy, and Pachner 2007; Hato et al. 2013; Theil et al. 2002; Arbusow et al. 1999).

Auch der Respirationstrakt kann durch HSV-1 in Mitleidenschaft gezogen werden. So konnte das Virus beispielweise bei Patienten mit ARDS vermehrt nachgewiesen werden.

Insbesondere bei abwehrgeschwächten Individuen ist eine viszerale Infektion möglich. Ein gefürchteter Verlauf ist die HSV Enzephalitis (HSE). Sie stellt eine gefährliche Form der HSV-1 Reaktivierung dar, die mit Fieber, alternierenden Bewusstseinszuständen, Verhaltensauffälligkeiten und fokale neurologischen Defiziten einhergeht. Hier ist besonders schnelles diagnostisches Handeln und sofortiges Einleiten therapeutischer Maßnahmen gefragt (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998). Während die anderen klinischen Manifestationen des HSV-1 eher gemäßigt verlaufen, ist die HSE eine lebensbedrohliche Erkrankung, die mit einer schlechten Prognose einhergeht (Rozenberg, Deback, and Agut 2011).

1.1.5 Lytische Infektion und Replikation

Es kann zwischen der Primärinfektion, bei der das Individuum zum ersten Mal mit dem HSV-1 in Berührung kommt und der reaktivierten, wiederkehrenden Infektion unterschieden werden. Bei der Primärinfektion werden Zellen der oralen oder genitalen Schleimhaut infiziert. Dabei vermehrt sich das Virus lytisch. Im Anschluss daran gelangt das Virus über Zell-zu-Zell-Kontakte zu den freien Nervenendigungen. Dort kommt es zu einer Initialinfektion mit viraler Replikation. Nachfolgend findet der retrograde axonale Transport des Virus in die jeweiligen Nuklei der sensorischen

Ganglien statt, wo das Virus lebenslang persistieren kann (Stevens and Cook 1971; Modrow S. 2003).

Durch neuronalen Stress kann es zu einer Reaktivierung des HSV-1 kommen (Cliffe et al. 2015). Hier erfolgt die Vermehrung wiederum lytisch (produktive Infektion). Das Virus wandert in diesem Fall vom Ganglion, entlang der Nervenleitschiene, zu seinem Zielort, um dort zur Ausbildung von Bläschen zu führen (Modrow S. 2003).

Der Ablauf des lytischen Infektionszyklus wird im Folgenden besprochen:

Das Virus bindet bei der Infektion an Oberflächenrezeptoren der Zielzelle. Die viralen Glykoproteine, die sich auf der Oberfläche des HSV-1 befinden, spielen hierbei eine wichtige Rolle. Zu nennen sind die Glykoproteine gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL und gM, von denen einige beim Anheftungs- und Eindringungsprozess eine Rolle spielen. Die Glykoproteine gC und gB sind bedeutend für die Anheftung des Virus an die Wirtszelle, während gD zum Eindringen in die Zielzelle benötigt wird. Schließlich fusioniert die Virushülle mit der Plasmamembran der Zielzelle. Folglich kann die Kapsid-Tegument-Struktur ins Zytoplasma gelangen. Somit ist der Viruseintritt vollzogen.

Mit Hilfe von Mikrotubuli erreicht das Kapsid die Kernporen, wo das virale Genom in den Zellkern abgegeben wird und dort in eine zirkuläre Form übergeht. Falls die Zielzelle nicht die zum Eindringen benötigten Rezeptoren besitzt, kann das Virus über eine Membranfusion dennoch zu einer Infektion der Zielzelle führen (Modrow S. 2003). Bei der lytischen (produktiven) Infektion, bei der das virale Genom repliziert wird und infektiöse Virionen gebildet werden, wird die Genexpression stark reguliert. Bei der lytischen Infektion geht die Wirtszelle in der Regel zugrunde (Preston 2000; Grinde 2013).

Die virale Vermehrung setzt sich zusammen aus: Transkription, Translation, Replikation der Virus-DNA, Aufbau des Kapsids, Verpacken der DNA und Virusumhüllung (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998).

Der zeitliche Verlauf der viralen Genexpression wird in drei Abschnitte unterteilt:

Zuerst werden die *immediate early (IE)* Proteine oder α Proteine gebildet. Sie regulieren den Ablauf der lytischen Infektion, indem sie Promotoren der *early*- und *late*-Gene aktivieren (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998; Modrow S. 2003). Somit stellen die fünf IE Proteine ICP4, ICP27, ICP0, ICP22 und ICP47 die Voraussetzung für eine produktive Infektion dar (Preston 2000).

Darauffolgend werden die *early (E)* oder auch β Proteine gebildet. Hierzu gehören Enzyme und Polypeptide, die für die Replikation der Virus-DNA notwendig sind. Die β Proteine sind ein häufiges Ziel in der antiviralen Therapie.

Die dritte Gruppe sind die late (L) oder γ Proteine. Diese Proteine sind für die Struktur (Kapsid und Tegument) neuer Partikel notwendig.

Die Replikation der viralen DNA vollzieht sich zeitgleich mit der Expression der späten Gene.

Der Zusammenbau der einzelnen Komponenten erfolgt im Zellkern. Die DNA wird geschnitten und anschließend in Core und Kapsid verpackt. An das Kapsid lagern sich die Tegumentproteine an. Diese haben eine Verbindung zu der inneren Kernmembran, in der sich die notwendigen Glykoproteine befinden. Durch Ausstülpfen der inneren Kernmembran erfolgt die Umhüllung der Kapsid-Tegument-Struktur und die Abgabe in den Raum zwischen innerer und äußerer Nukleus Membran. Am Endoplasmatischen Reticulum (ER) verschmilzt die vorhin gebildete Hülle mit der ER-Membran. Erst am Golgi Apparat erfolgt die endgültige Umhüllung. Nach Modifikation der Oberflächenproteine gelangen die infektiösen Virionen zur Oberfläche und werden freigelassen, um weitere Zellen infizieren zu können (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998; Modrow S. 2003).

Histopathologische Untersuchungen der Haut zeigen während einer lytischen Infektion Zeichen des zellulären Untergangs des infizierten Wirts und eine inflammatorische Antwort des Gewebes. So kommt es zur Degeneration des Nukleus und der Plasmamembran der infizierten Zellen und zum Einwandern von Immunzellen (Granulozyten, CD4-positive T-Zellen, Makrophagen). Nach der Lyse der Epithelzellen bildet sich eine klare Flüssigkeit, die eine große Menge an Viren enthält. Diese Flüssigkeit befindet sich zwischen Epidermis und Dermis. Beim Abheilen erscheinen die entstandenen Bläschen eitrig. Falls auch die Membran der Schleimhaut mit betroffen ist, können flache Schleimhautulzera entstehen (Grinde 2013; Preston 2000). Sind Neurone der Ganglien lytisch infiziert, zeigen sich ebenfalls Zeichen der Entzündung. CD4- und CD8-positiven T-Zellen kommt hier eine bedeutende Rolle zu. Im Verlauf können die Neurone nekrotisch werden (Modrow S. 2003).

1.1.6 Latente Infektion des HSV-1

Nach der Primärinfektion kann das Virus in Neuronen der sensorischen Ganglien latent werden. Das virale Genom bleibt hierbei erhalten, jedoch wird es nur begrenzt transkribiert und nicht repliziert (Preston 2000; Margolis et al. 2007). Beim Menschen konnte eine latente Infektion durch Nachweis des Latenz-assoziierten Transkripts (LAT) vor allem in Trigeminalganglien (TG) nachgewiesen werden. LAT ist eine RNA, die nicht für Proteine codiert. Ihr kommt eine bedeutende Rolle bei der Regulierung der HSV-1 Genexpression während der Latenz zu. LAT ist das einzige virale Genprodukt,

welches während der latenten Phase in größeren Mengen exprimiert wird (Nicoll et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass der *Activating transcription factor 3* (ATF3), der vermehrt unter Stressbedingungen verzeichnet werden kann, positiv mit der Akkumulation von LAT korreliert (Shu et al. 2015). Das HSV-1 kann auch im Ganglion geniculatum (GG) und im Vestibularganglion (VG) latent werden, jedoch sind bei diesen kranialen Ganglien geringere Mengen von LAT nachweisbar (Theil et al. 2001; Arbusow et al. 2010). Auch Neurone in den Spiral- und Sakralganglien können das latente Virus beherbergen (Wilson and Mohr 2012; Held and Derfuss 2011).

Während der Phase der Latenz liegt die DNA in einer zirkulären Form, assoziiert mit Nukleosomen, vor, ähnlich dem zellulären Chromatin. Im Vergleich dazu ist während der replikativen Phase die DNA linear im Zellkern angeordnet. Möglicherweise spielt die Anordnung in einen Chromatin-ähnlichen Zustand eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der limitierten Genexpression während der Latenz (Deshmane and Fraser 1989).

Die LAT-RNA entsteht nach Splicing eines eher instabilen Primärtranskripts (8.5 kb) und ist selbst 2 kb groß. Es akkumuliert in neuronalen Zellkernen und ist ein stabiles Intron (Wagner and Bloom 1997; Farrell, Dobson, and Feldman 1991). LAT scheint sowohl bei der Etablierung des Latenzzustands als auch bei der Reaktivierung eine wichtige Rolle zu spielen (Perng et al. 1994; Perng, Slanina, et al. 2000; Thompson and Sawtell 1997; Sawtell 1997; Kent et al. 2003). Zudem beeinflusst LAT das neuronale Überleben positiv, indem der Zelltod durch Apoptose reduziert wird (Perng, Jones, et al. 2000; Ahmed et al. 2002). Eine von LAT ausgehende mikroRNA schützt vor Apoptose und sichert somit das Überleben der Wirtszelle (Gupta et al. 2006). Zudem kann es die Regeneration von Axonen stimulieren (Hamza et al. 2007).

Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob Peptide bzw. Proteine aus diesen Transkripten hervorgehen (Henderson et al. 2009). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Expression von LAT mit einer vermehrten Bildung ungeschnittener ICP0 Transkripte assoziiert ist. Man vermutet, dass LAT durch diesen Mechanismus, der gegen die Expression des IE Gens ICP0 wirkt, an der Aufrechterhaltung bzw. der Vermittlung des Latenzzustandes beteiligt ist (Maillet et al. 2006; Farrell, Dobson, and Feldman 1991). Es wird mittlerweile in Frage gestellt, ob LAT das einzige Transkript in der Latenzphase darstellt, da bei Mäusen geringe Mengen an Transkripten der ICP4- und der Thymidin Kinase Gene nachgewiesen werden konnten (Kramer and Coen 1995). Zudem konnte im murinen TG gezeigt werden, dass Gene des produktiven Zyklus während der Latenz exprimiert werden können. Dieses Phänomen wird als spontane molekulare Reaktivierung bezeichnet (Feldman et al. 2002). Auch im humanen latent infizierten TG konnten noch weitere Transkripte identifiziert werden (Derfuss et al. 2007). Des

Weiteren bleibt zu beachten, dass noch Unklarheit darüber besteht, ob LAT in allen latent infizierten Zellen mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden kann, oder ob Zellen mit dieser Methode nur ab einer bestimmten LAT Menge detektiert werden können (Held et al. 2011; Wang et al. 2005).

1.1.7 Einfluss von Wirtsfaktoren auf die HSV-1 Latenz

1.1.7.1 Die Rolle des Immunsystems bei der HSV-1 Latenz

Auf Seiten des Wirts hat das Immunsystem eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung, Aufrechterhaltung und schließlich Beendigung (somit Reaktivierung) der HSV-1 Latenz: Die CD8⁺ T-Zellen scheinen einer Reaktivierung vorzubeugen und den Latenzzustand zu fördern, ohne die Zelle zu zerstören (Liu et al. 2000; Sheridan, Knickelbein, and Hendricks 2007). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es nach einer cornealen HSV-1 Primärinfektion zur Infiltration des Ganglion trigeminale mit CD8⁺ T-Zellen kommt. Dass die CD8⁺ T-Zellen Schutz vor einer Reaktivierung bieten, wird im Mausmodell in Zusammenhang mit der Bildung von INF γ und anderen antiviralen Zytokinen gesehen (Liu et al. 2001). Weiterhin soll das Granzym B eine Rolle bei der Latenzerhaltung spielen (Knickelbein et al. 2008).

Auch beim Menschen konnte nachgewiesen werden, dass die latente HSV-1 Infektion mit einer chronischen Immunreaktion einhergeht. Es zeigte sich, dass ein Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Immunzellen und dem Nachweis von LAT besteht. Seitens der Immunzellen konnten CD3⁺ T-Zellen nachgewiesen werden, wobei die Mehrzahl der im TG nachgewiesenen T-Zellen CD8⁺ waren. Des Weiteren zeigten sich bei den infizierten Ganglien CD68⁺ Makrophagen und eine geringe Anzahl an CD4⁺ T-Zellen. Zusätzlich zeigte sich eine vermehrte Bildung an INF γ und TNF α . Auch die Chemokin Transkripte IP-10 und RANTES, durch die Immunzellen angelockt werden, konnten in infizierten TGs vermehrt detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren in nicht infizierten Trigeminalganglien keine Immunzellen nachweisbar (Theil et al. 2003). Zudem konnte durch Untersuchen der drei Hauptäste des Ganglion trigeminale, bestehend aus Nervus ophthalmicus (V1), Nervus maxillaris (V2) und Nervus mandibularis (V3), folgendes beobachtet werden: Während in den Ästen V2 und V3 des humanen TGs reichlich LAT nachweisbar war, war dies im Bereich V1 nur selten oder gar nicht detektierbar. Zusätzlich konnten vermehrt CD3/CD8⁺ T-Zellen, die sich clusterartig um die Neuronen angeordnet hatten, in den Ästen V2 und V3 nachgewiesen werden. Im Ast V1 zeigten sich jedoch weniger durch T-Zellen umgebende Neurone. Ein weiterer Unterschied lag darin, dass die Granzym B-positiven T-Zellen nur in V2 und V3 zu finden waren, nicht aber in V1.

Zusammenfassend konnten in den Ästen V2 und V3 sowohl vermehrt LAT als auch CD3/CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden. Zudem kam es in den besagten Ästen klinisch häufiger zur Reaktivierung (Hufner et al. 2009).

Bei der Charakterisierung der CD8+ T-Zellen fiel auf, dass sie zum einen die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR3 coexprimieren und zum anderen Merkmale aufweisen, die vergleichbar sind mit Effektor Gedächtniszellen (Dorfuss et al. 2007).

Dem Virus ist es gelungen, Strategien zu entwickeln, um dem Immunsystem des Wirts entgegenzuwirken bzw. diesem zu entkommen. Zu nennen ist hierbei die Beeinflussung und sogar Inhibierung des MHC Klasse I Antigens und die damit verbundene reduzierte Präsentation viraler Epitope auf der Zelloberfläche des infizierten Wirts. Einige Mechanismen, die diesem Ziel dienen, sind die Downregulation der Synthese der MHC Klasse I Antigene, die Möglichkeit, MHC Klasse I Moleküle im Endoplasmatischen Retikulum zurückzuhalten, und die Degradierung der Moleküle durch endozytotische Prozesse, die direkt an der Plasmamembran wirken. Somit ist das Herpesvirus in der Lage, durch die Downregulation der MHC Klasse I Moleküle an der Zelloberfläche dem Immunsystem des Wirts, wie z.B. den zytotoxischen T-Lymphozyten, zu entkommen (Griffin, Verweij, and Wiertz 2010).

Abschließend zeigt die Tatsache, dass Immunsuppression ein Trigger für die Reaktivierung einer HSV-1 Infektion darstellt, die bedeutende Rolle des Immunsystems auf. So konnten bei immunsupprimierten Patienten schwere Verläufe nach Reaktivierung beobachtet werden (Whitley, Kimberlin, and Roizman 1998; Naraqi et al. 1977). Auch chronische Verläufe der HSV-1 Infektion (von mindestens einem Monat Dauer) sind vermehrt bei Immunsuppression, beispielsweise bei HIV positiven Patienten, zu verzeichnen. Des Weiteren können beispielsweise Fieber und Stress zu einer Schwächung des Immunsystems führen und somit eine Reaktivierung begünstigen (Wauters, Lebas, and Nikkels 2012).

1.1.7.2 Die Rolle des Neurons bei der HSV-1 Latenz

Während die Rolle des Immunsystems bei der Erhaltung der HSV-1 Latenz sowohl in Tiermodellen als auch beim Menschen mehrfach Ziel der Forschung war, wurde die Bedeutung der Wirtszellen, nämlich der Neurone, bislang vornehmlich im Tiermodell untersucht. Im Gegensatz dazu beschäftigt sich diese Arbeit mit den Wirtszellen beim Menschen.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass verschiedene neuronale Populationen des TGs, die durch bestimmte Eigenschaften charakterisiert werden konnten, Unterschiede in der Anfälligkeit für eine latente HSV-1 Infektion aufwiesen. Prinzipiell können alle neuronalen Populationen des Ganglion trigeminale infiziert werden. Bei

jedoch sowohl lytischer als auch latenter HSV-1 Infektion gibt es anfälliger und weniger anfällige neuronale Phänotypen. Es wird daher angenommen, dass auch der Wirtszelle eine bedeutende Rolle bei der Regulation der viralen Genexpression zukommt (Yang, Voytek, and Margolis 2000; Margolis et al. 1992). In Untersuchungen des TGs im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass produktive Infektionen mit HSV-1 vermehrt in bestimmten neuronalen Populationen auftreten. So beispielsweise in Neuronen, die immunoreaktiv auf den monoklonalen Antikörper KH10 (lactoseries glycoconjugates erkannt durch den monoklonalen Antikörper KH10) sind. Im murinen TG scheinen Neurone, die immunoreaktiv auf den monoklonalen Antikörper A5 sind, besonders empfänglich für eine latente Infektion zu sein (Yang, Voytek, and Margolis 2000; Dodd and Jessell 1985). Auch die neuronalen Marker SSEA3 (globoseries glycoconjugate stage specific embryonic antigen 3) und TrkA (*nerve growth factor Tyrosin Kinase A*) zeigten im TG der Maus eine Bevorzugung für den Latenzzustand (Yang, Voytek, and Margolis 2000).

Auch im DRG konnte eine ähnliche Verteilung der neuronalen Marker bezüglich produktiver und latenter Infektion nachgewiesen werden. So waren SSEA3, TrkA und A5 positive Neurone vermehrt latent infiziert, während KH10 positive Neurone vermehrt produktiv infiziert waren (Yang, Voytek, and Margolis 2000).

Beim Vergleich der latenten HSV-1 mit der latenten HSV-2 Infektion im Mausmodell zeigte sich, dass sich eine latente Infektion (nachgewiesen durch LAT) im Falle von HSV-1 vermehrt in A5 positiven Neuronen etabliert, während im Gegensatz dazu das HSV-2 bevorzugt KH10 positive Neurone latent befällt. Es ist somit anzunehmen, dass das HSV-1 und das HSV-2 für ihre latenten Infektionen jeweils unterschiedliche Nischen beanspruchen. Es ist anzunehmen, dass mehr A5 positive Neurone eine akute Infektion mit HSV-1 überleben und anschließend in eine latente Infektion übergehen (Margolis et al. 2007). In einer in vitro Studie an murinen TGs wurde die Bedeutung der A5 positiven Neurone in Hinblick auf die produktive Infektion bzw. eine mögliche Reaktivierung untersucht. In A5 positiven Neuronen kam es bei HSV-2 zu einer produktiven Infektion. Im Falle des HSV-1 war die A5 positive neuronale Population nicht anfällig für eine lytische Infektion und ebenso nicht anfällig für eine Reaktivierung (Bertke et al. 2011).

Es lässt darauf schließen, dass die Wirtszelle eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Infektion spielt. Es wird angenommen, dass bestimmte neuronale Eigenschaften dazu führen könnten, dass eine aktive Infektion entweder in eine produktive oder eine latente virale Genexpression übergeht (Yang, Voytek, and Margolis 2000).

1.2 Neuronale Populationen und ihre Marker

1.2.1 Genereller Aufbau sensorischer Ganglien

Die Sensorischen Ganglien setzen sich aus diversen neuronalen Populationen zusammen. Einteilungen richten sich nach morphologischen, neurochemischen und funktionellen Eigenschaften (Sommer, Kazimierzak, and Droz 1985; Margolis et al. 2007). Die klassische Einteilung sensorischer Neurone erfolgt anhand der Größe in mehrere Hauptgruppen: Der Typ A beschreibt Neurone, die groß und hell sind (LLC = large light). Von diesen leiten sich die A α / β Fasern ab, die einen dickeren Durchmesser haben und myelinisiert sind. Der Typ B beschreibt hingegen kleine und dunkle Neurone (SDC = small dark). Hiervon entspringen die dünnen, myelinisierten A δ Fasern und die unmyelinisierten Typ C Fasern (Lazarov 2002; Haycock and Bro 1975; Gaik and Farbman 1973; Dubner and Bennett 1983).

Untersuchungen des TGs der Katze und der Ratte ergaben drei Gruppen bezüglich der Zellgröße: Die kleinen Zellen mit einem Durchmesser von 20-30 μm (Flächenmaß: 314,16 μm^2 - 706,86 μm^2), die vornehmlich mit kutanen Ästen assoziiert sind, stellen die erste Gruppe dar. Die zweite Gruppe, die der mittelgroßen Zellen, zeichnet sich durch einen Durchmesser von 30-50 μm aus (Flächenmaß: 706,86 μm^2 - 1963,5 μm^2) und steht v.a. in Bezug zu cornealen Afferenzen. Schließlich stellt die Gruppe der großen Neurone mit einem Durchmesser von 50-80 μm (Flächenmaß: 1963,5 μm^2 - 5026,55 μm^2) die dritte Gruppe dar und wird in Verbindung mit oralen und perioralen Ästen gebracht (Lazarov 2002; Marfurt 1981; Sugimoto et al. 1986). Zudem konnte im Rahmen einer Studie die Aufteilung anhand der perikaryonealen Größe der Neurone des humanen TGs näher betrachtet werden: Hierbei machten die mittelgroßen Neurone mit 81-85% den häufigsten Teil aus. Im Vergleich dazu waren die kleinen Neurone mit 9,75%, und die großen Neurone mit 8,39%, in geringerer Anzahl vertreten (Borsani et al. 2010).

Ausgehend von der oben erwähnten Gruppierung können weitere Unterteilungen vorgenommen werden, wie beispielsweise die Anordnung von zytoplasmatischen Organellen oder Immunoreaktivität auf bestimmte Strukturen, die wiederum für die Typen A - B charakteristisch sind (Kai-Kai 1989). Die neurochemische Einteilung der Neurone des TGs wurde bei Säugetieren näher betrachtet: Die Zuordnung erfolgte in zwei Subpopulationen, die sich zum einen hinsichtlich der Größe der neuronalen Somata und zum anderen durch die charakteristische Expression bestimmter Proteine, Neuropeptide und Neurotransmitter unterschieden: Neurone, deren Somata klein oder mittelgroß waren, zeigten sich für Glutamat (Glu), Substanz P (SP), Neurokinin A

(NKA), Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Cholecystokinin (CCK), Somatostatin (SOM), vasoactive intestinal polypeptide (VIP) und Galanin (GAL) immunoreaktiv. Bei den weniger häufig vorkommenden großen Zellkörpern wurden v.a. positive Reaktionen für die Neuropeptide Neuropeptid Y (NPY) und Peptid 19 (PEP19) nachgewiesen. Das Vorhandensein von Parvalbumin (PV) und der *nitric oxide synthase* (NOS) konnte bei allen Zellgrößen beobachtet werden. Schließlich wurden bei einigen wenigen größeren Zellen Calbindin D-28k (CB) nachgewiesen (Lazarov 2002).

1.2.2 Die *glial cell line-derived neurotrophic factor-*

***Family Ligand* Rezeptor Tyrosin Kinase RET**

RET (REarranged during Transfection) stellt einen wichtigen Anteil des GFL-Rezeptorkomplexes (*GDNF Family Ligands Rezeptorkomplex*) dar. Betrachtet man den GFL-Rezeptorkomplex näher, so setzt sich dieser aus der transmembranen Rezeptor Tyrosin Kinase RET als signalisierender Teil und einer Komponente, die den Liganden, bindet zusammen. Diese Komponente wird als *GDNF Family Receptor α* (GFR α 1-4) bezeichnet. Die Aktivierung der Rezeptor Tyrosin Kinase RET wird zum einen durch einen löslichen GFL (*GDNF Family Ligand*) und zum andern durch den durch Glycosylphosphatidylinositol verankerten Corezeptor (GFR α) vermittelt (Runeberg-Roos and Saarma 2007). Da RET in allen GFL-Rezeptor-Komplexen zur Signalübertragung notwendig ist, stellt diese einen wichtigen Partner des jeweiligen GFR α Corezeptors dar. Nur zusammen kann es zu einem funktionellen Rezeptorkomplex kommen (Airaksinen and Saarma 2002; Golden et al. 2010; Runeberg-Roos and Saarma 2007).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass GFL/RET wichtig ist für das neuronale Überleben sensorischer Neurone sowie für deren Struktur und Funktion (Airaksinen and Saarma 2002; Bennett et al. 1998; Bennett et al. 2000; Ernsberger 2008; Malin and Davis 2008; Golden et al. 2010). Auch die Entwicklung sympathischer und parasympathischer Neurone wird durch RET reguliert. Des Weiteren spielt RET eine Rolle bei motorischen und sensorischen neuronalen Entwicklungsprozessen (Runeberg-Roos and Saarma 2007). In einer in vitro Studie konnte gezeigt werden, dass GDNF das Überleben kleiner Neurone fördert, die RET exprimieren und IB4 binden, während die Neurone, die TrkA (*nerve growth factor Tyrosin Kinase A*) und CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*) exprimierten, untergingen (Molliver et al. 1997). Im Mausmodell konnte man feststellen, dass die Signalübertragung durch RET

bedeutend für den trophischen Erhalt der nicht-peptidergen Neurone im DRG ist (Golden et al. 2010).

Bei Versuchen im DRG fiel auf, dass sich aus Nozizeptoren, die sich zum einen durch kleine Durchmesser und zum anderen durch unmyelinisierte Fasern der sensorischen Neurone auszeichnen, zwei unterschiedliche Populationen in der späten Embryonalphase bzw. frühen Postnatalphase entwickeln: Bei der einen wird die Expression des NGF Rezeptors TrkA fortgeführt, und die Bildung von Neuropeptiden setzt ein. Bei der anderen Population wird die TrkA Expression runterreguliert und es kommt zu einem Anstieg der RET⁺ Neurone. Die RET Expression bleibt bis ins Erwachsenenalter erhalten (Molliver et al. 1997; Franck et al. 2011; Luo et al. 2007; Marmigere and Ernfors 2007).

Eine Überlappung der Immunopositivität für sowohl TrkA als auch RET konnte bei nur 5% der Neurone des DRGs im Erwachsenenalter nachgewiesen werden (Molliver et al. 1997). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die NGF/TrkA positive Population Neuropeptide, wie CGRP, exprimiert. Daher können diese sensorischen Neurone als peptiderge Nozizeptoren bezeichnet werden. Sie projizieren in die Lamina I und den äußeren Anteil der Lamina II der Hinterwurzel. Im Gegensatz dazu exprimieren die RET⁺ Neurone typischerweise keine Neuropeptide und werden darum als nicht-peptiderge Nozizeptoren bezeichnet. Sie binden jedoch im Vergleich zu den TrkA⁺ Neuronen Isolectin B4 (IB4), exprimieren den delta Opioid Rezeptor (DOR), den ATP Rezeptor P2X3 und bilden die Thiamin Monophosphatase (TMP). Deren Projektion führt zum inneren Teil der Lamina II des Hinterhorns (Braz, Rico, and Basbaum 2002; Molliver et al. 1997; Zylka, Rice, and Anderson 2005; Golden et al. 2010; Franck et al. 2011; Snider and McMahon 1998; Marmigere and Ernfors 2007; Scherrer et al. 2009; Woolf and Ma 2007).

Im TG waren die Mehrzahl der RET⁺ Neurone zusätzlich positiv für GFR α 1 und den Liganden GDNF. Der Marker RET konnte in humanem neuronalen Gewebe sowohl als Membranprotein als auch im Zytoplasma und im Golgi Apparat nachgewiesen werden (Quartu et al. 2006). Bei der Untersuchung neuronaler Populationen des TGs im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass RET v.a. in Neuronen detektiert werden kann, die immunoreaktiv auf den monoklonalen Antikörper KH10 sind und somit eher mit einer produktiven HSV-1 Infektion einhergehen. Im Gegensatz dazu weisen A5 positive Neurone nur eine geringe gleichzeitige Überlappung mit RET auf (Margolis et al. 2007). Es besteht die Hoffnung, dass die Liganden der GDNF Familie zur therapeutischen Anwendung bei Schädigung sensorischer Neurone kommen könnten (Airaksinen and Saarma 2002; Apfel 1999; Leininger, Vincent, and Feldman 2004; Ramer, Priestley, and McMahon 2000; Snider and McMahon 1998; Quartu et al. 2006).

1.2.3 Die *nerve growth factor* Rezeptor Tyrosin Kinase A TrkA

Die Rezeptor Tyrosin Kinase A (TrkA) ist ein Rezeptor, an den der NGF (*nerve growth factor*) mit hoher Affinität bindet (=high-affinity receptor tyrosine kinase A) (Fang et al. 2005; Barbacid 1994). Mitglieder der Familie der Tyrosin Protein Kinase Rezeptoren, zu denen TrkA, TrkB und TrkC gehören, kommen sowohl im TG, im DRG, in sympathischen Ganglien als auch in Teilen des Gehirns, wie Frontalhirn und Striatum, vor (Barbacid 1994; Quartu, Geic, and Del Fiacco 1997). Im humanen TG ist TrkA bis ins Erwachsenenalter nachweisbar, auch wenn der Rezeptor bei Neugeborenen in höherer Zahl vorhanden ist (Quartu, Geic, and Del Fiacco 1997). Beim Menschen konnte TrkA im Zytoplasma, im Golgi Apparat und an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Quartu, Setzu, and Del Fiacco 1996; Sniderhan et al. 2009).

Der NGF, der zu den Neurotrophinen gehört, ist entscheidend für die Entwicklung und den Erhalt sowohl des peripheren als auch des zentralen Nervensystems. So wird das Überleben der Zelle gesichert, die Differenzierung und Proliferation kontrolliert, das Wachstum eingeschränkt und die Apoptose des sensorischen Neurons beeinflusst. Zudem scheinen die Neurotrophine Einfluss auf neuronale Reparationsvorgänge und axonales Aussprossen zu nehmen (Wiesmann and de Vos 2001; Pezet and McMahon 2006; Lewin and Barde 1996; Quartu, Geic, and Del Fiacco 1997; Huang et al. 1999; Wetmore and Olson 1995). Im DRG sichert der NGF das Überleben der Zelle während ihrer Entwicklung (Goedert et al. 1984; Fang et al. 2005). Außerdem spielt der NGF eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des nozizeptiven Phänotyps im Erwachsenenalter (Mendell 1999; Fang et al. 2005). Der NGF konnte sowohl beim Menschen als auch beim Tier als peripherer Schmerzmediator identifiziert werden. Somit ist TrkA mit der Signalübertragung von Schmerzreizen assoziiert (Pezet and McMahon 2006). Die Kolo-kalisierung mit dem Neuropeptid CGRP, welches bei der Schmerzwahrnehmung eine wichtige Rolle spielt, deutet bereits auf die Bedeutung von TrkA in der neuronalen Schmerzempfindung hin (Averill et al. 1995; Molliver et al. 1997). Zudem exprimieren eine Vielzahl dieser Neurone das Neuropeptid Substanz P, einen weiteren Schmerzmediator (Molliver et al. 1997; Lawson, Crepps, and Perl 2002; Lawson, Crepps, and Perl 1997; Kashiba, Ueda, and Senba 1996). Für das DRG der Ratte konnte gezeigt werden, dass die TrkA Expression den nozizeptiven Neuronen vorbehalten ist. Hierbei war die TrkA Expression in schnell leitenden (*rapidly conducting*) A α / β ungefähr gleich häufig wie bei den langsamer leitenden (*more slowly conducting*) A δ und C Nozizeptoren. Zudem scheint sich die TrkA Expression auf elektrophysiologische Eigenschaften der Neurone auszuwirken. So fiel auf, dass in A α / β Nozizeptoren die Leitungsgeschwindigkeit mit der TrkA Dichte negativ korreliert, und dass ein Zusammenhang zwischen der TrkA Expression und dem Vorhandensein

von Natriumkanälen (Nav1.8) besteht (Fang et al. 2005). Es wurde die Hypothese gestellt, dass die HSV Genexpression durch den NGF reguliert werden könnte, da wie bereits unter 1.1.7.2 erwähnt, TrkA positive Neurone des murinen TGs eine Präferenz für den latenten Zustand des Herpes Simplex Virus haben. Es könnte also sein, dass die NGF Responsivität eine Rolle bei der Festlegung, welche der Zellen während der Primärinfektion in einen latenten Zustand übergehen sollen, spielen könnte. Wie der NGF und somit TrkA die virale Genexpression beeinflusst ist weitestgehend ungeklärt (Yang, Voytek, and Margolis 2000). In einer in vitro Studie, in der Regulationsmechanismen des LAT Promotors untersucht wurden, hatte der NGF einen aktivierenden Einfluss auf den LAT Promotor und die Genexpression (Frazier et al. 1996). Ebenfalls konnte in einer in vitro Studie gezeigt werden, dass der Entzug von NGF zur Reaktivierung des HSV-1 führen kann (Smith et al. 1992). Da die TrkA Expression besonders mit A5 positiven Neuronen im murinen Modell einhergeht, und im Gegensatz dazu so gut wie keine Überlappung mit KH10 positiver Immunoreaktivität nachgewiesen wurde, kann angenommen werden, dass die TrkA positiven Neurone in einer Vielzahl der Fälle äquivalent zu den A5 positiven im Mausmodell sind (Margolis et al. 2007).

1.2.4 Die neuronale Stickstoffmonoxid Synthase nNOS

Das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) entsteht aus L-Arginin. Es wird vorgeblich in Neuronen von zwei Enzymen gebildet: zum einen von der konstitutiven, neuronalen NO Synthase (nNOS) und zum anderen von der induzierbaren NO Synthase (iNOS). Während nNOS in den Neuronen selbst lokalisiert ist und für seine Aktivierung auf Calcium angewiesen ist, befindet sich iNOS bevorzugt in Gliazellen und wird nur unter pathologischen Bedingungen durch Endotoxine und Zytokine aktiviert (Jenkins et al. 1994). Der Nachweis von nNOS gelang bisher vornehmlich im Zytoplasma (Borsani et al. 2010). Die dritte Form der NO Synthesen wird als endotheliale NO Synthase (eNOS) bezeichnet, die ihre Wirkung in Blutgefäßen entfaltet. NO scheint im Trigeminalem Sensorischen System, sowohl zentral im MTN (*mesencephalic trigeminal nucleus*) als auch peripher im TG, an der Neurotransmission als Messengermolekül beteiligt zu sein (Borsani et al. 2010; Snyder 1992; Schuman and Madison 1991; Lazarov and Dandov 1998). nNOS ist bei der Übermittlung von Schmerzreizen beteiligt (Borsani et al. 2010; Marcaccini et al. 2007). Besonders im Bereich des Migräneschmerzes kommt dem Trigeminalem Sensorischen System eine bedeutende Rolle zu (Malick and Burstein 2000; Ramachandran et al. 2010). NO produzierende Neurone scheinen auch vermehrt auf den Nachweis von SP oder CGRP positiv zu

reagieren, was wiederum mit der Schmerzwahrnehmung in Verbindung steht (Aimi et al. 1991; Lazarov 2002; Molliver et al. 1997; Averill et al. 1995). Bei Untersuchungen des Nervensystems am Schwein konnte gezeigt werden, dass es bei einer Infektion durch das tierpathogene Alpha Herpes Virus Pseudorabies (PRV=Pseudorabiesvirus, Pseudowut) zu einer generellen Hochregulierung der NO Produktion in unterschiedlichen Zelltypen kommt. Es ist davon auszugehen, dass NO eine wichtige Rolle bei der Immunantwort bei viralen Infektionen einnimmt (Marcaccini et al. 2007). Der direkte antivirale Effekt, den TNF α und INF γ auf die HSV-1 Infektion haben, steht im Zusammenhang mit der Stimulation von iNOS und der folglich vermehrten NO Produktion (Ellermann-Eriksen 2005; Feduchi, Alonso, and Carrasco 1989; Feduchi and Carrasco 1991; Karupiah et al. 1993). Der antivirale Effekt von NO wird durch die Suppression viraler mRNA und der Proteinsynthese herbeigeführt (Croen 1993; Komatsu, Srivastava, et al. 1999). Zum anderen wird vermutet, dass der antimikrobielle Effekt, den NO bei der HSV-1 Infektion hat, durch Hemmung der Replikation des Virus zustande kommt (Croen 1993; Komatsu, Bi, and Reiss 1996; Reiss and Komatsu 1998; Yang, Voytek, and Margolis 2000). Bei iNOS defizienten Mäusen bzw. bei der Gabe von NOS Inhibitoren konnte eine vermehrte Anfälligkeit für eine HSV-1 Infektion verzeichnet werden (Adler et al. 1997; Gamba et al. 2004; MacLean et al. 1998). Zudem besitzt NO eine zytotoxische Eigenschaft durch Bildung des Radikals Peroxynitrit (ONOO⁻) (Akaike and Maeda 2000; Zaki, Akuta, and Akaike 2005). Der zytotoxische Effekt konnte im Tiermodell sowohl nach einer HSV-1 Infektion des Gehirns als auch nach einer HSV-1 induzierten Pneumonie beobachtet werden (Fujii, Akaike, and Maeda 1999; Meyding-Lamade et al. 2002; Adler et al. 1997). Bei Infektionen durch neurotrope Viren konnte beim Tier zum einen gezeigt werden, dass das Gewebe von Immunzellen infiltriert wird, die vornehmlich über die iNOS große Mengen an NO produzieren, und zum anderen die Anzahl der nNOS positiven Neurone in infizierten Gebieten ansteigt (Komatsu, Ireland, et al. 1999; Serrano, Enquist, and Card 2002).

1.3 Ziel der Arbeit

In der Literatur gibt es viele Studien, die sich mit dem HSV-1 beschäftigt haben, jedoch nur wenige, die die neuronalen Populationen, die von dem Virus befallen werden, charakterisiert haben. Bisher wurde hier nur am Tiermodell gearbeitet.

In dieser Studie sollte zum einen der Aufbau des humanen Ganglion trigeminale untersucht werden und eine Charakterisierung verschiedener neuronaler Populationen durchgeführt werden. Hierzu sollten Neurone des humanen TGs durch Immunhistochemie auf drei auserwählte Marker getestet werden, die stellvertretend für die jeweilige neuronale Population stehen sollten. Zu den drei getesteten Markerproteinen gehörten die *GDNF-Family Ligand* Rezeptor Tyrosin Kinase RET, die NGF Rezeptor Tyrosin Kinase A TrkA und die neuronale Stickstoffmonoxid Synthase nNOS. Die Charakterisierung dieser Populationen sollte durch Anteils- und Größenbestimmungen erfolgen. Eine Charakterisierung dieser Art des humanen Ganglion trigeminale durch die genannten Markerkombinationen war bislang noch nie erfolgt. Eine Besonderheit dieser Arbeit bestand darin, dass im Vergleich zu vorherigen Studien, eine Untersuchung des menschlichen Ganglion trigeminale durchgeführt wurde.

Zum anderen war es Ziel dieser Arbeit zu analysieren, ob neuronale Eigenschaften, dargestellt durch Markerproteine, bevorzugt mit einer latenten HSV-1 Infektion einhergehen. Somit sollte beurteilt werden, ob bestimmte neuronale Populationen, empfänglicher sind für die latente Infektion oder im Umkehrschluss, die Wirtszelle vor einer latenten Infektion mit HSV-1 geschützt wird.

Zum Nachweis der latenten Infektion sollte das Latenz-assoziierte Transkript LAT dargestellt werden. In einer Kombinationsfärbung aus Immunhistochemie, zum Nachweis des jeweiligen Markers und In-situ-Hybridisierung, zum Nachweis von LAT, sollte im Anschluss der Zusammenhang untersucht werden. Neben der Bestimmung der jeweiligen prozentualen Anteile, sollten auch die jeweiligen Größenverhältnisse zur weiteren Charakterisierung beitragen.

Zusammengefasst sollten die Eigenschaften der humanen Wirtszelle und deren Einfluss näher analysiert werden, um die HSV-1 Infektion beim Menschen in Zukunft besser verstehen zu können. Die Charakterisierung der infizierten und nicht infizierten Zellen, sollte zur differenzierten Betrachtung des Infektionsverhaltens des Virus beitragen. Das grundlegende Verständnis für die Latenz des HSV-1, dessen Reaktivierung und die Interaktion mit dem Wirt, ist Voraussetzung für zukünftige Fortschritte in der Entwicklung neuer Therapieansätze.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Auflistung der Geräte

Tabelle 2: Auflistung der Geräte

Inkubator (37°)	Heraeus Instruments, Hanau, D.
Kryostat 3050S	Leica Microsystems, Nussloch, D.
Lichtmikroskop Olympus BX41	Olympus, Hamburg, D.
Olympus Digitalkamera C-4040 Zoom	Olympus, Hamburg, D.
pH Meter Modell 420A	Orion, Boston, USA
Vortex Reagenzglasmixer	Neolab, Heidelberg, D.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Cryo Glue (Einfriermedium)	SLEE medical GmbH, Mainz, D.
Deckgläser 24x32 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D.
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, D.
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D.
Pipettenspitzen SafeSeal Tips	Biozym, Hessisch Oldendorf, D.
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D.
Reaktionsgefäß 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, D.
SuperFrost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, D.
Tissue Tek® Cryomold®	Sakura, Zoeterwoude, NL

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 4: Auflistung der Chemikalien

Blockierungsreagenz (für Blockierungs-Stammlösung)	Roche, Mannheim, D.
DAB Chromogen-Substrat (3-3'-diaminobenzidine)	DakoCytomation, Hamburg, D.
Dimethylpyrocarbonat DMPC	Sigma-Aldrich, Steinheim, D.
di-Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt, D.
Essigsäureanhydrid $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt, D.
Ethanol $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ 99,9%	Merck, Darmstadt, D.
Ficoll®	Sigma-Aldrich, Steinheim, D.
Kaliumchlorid KCl 99%	Merck, Darmstadt, D.
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	Merck, Darmstadt, D.
Maleinsäure $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, D.
Methanol CH_4O <i>p.a.</i> 99,9%	Merck, Darmstadt, D.
Natriumchlorid NaCl <i>p.a.</i> $\geq 99,9\%$	Carl Roth, Karlsruhe, D.
Natriumhydroxid NaOH Plätzchen <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt, D.
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D.
NBT/BCIP (für ISH)	Roche Diagnostics, Mannheim, D.
Paraformaldehyd $(\text{CH}_2\text{O})_n$ <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt, D.
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, D.
Polyvinylpyrrolidon $(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$	Sigma-Aldrich, Steinheim, D.
Salzsäure HCl <i>p.a.</i> 25%	Merck, Darmstadt, D.
Saure Hämaunlösung nach Mayer	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, D.
Triethanolamin $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$ <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt, D.

tri-Natriumcitrat-Dihydrat $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe, D.
Trizma® basisch $C_4H_{11}NO_3 \geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, D.
Tween® 20 <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt, D.
Wasserstoffperoxid H_2O_2 30%	Sigma-Aldrich, Steinheim, D.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Auflistung der Puffer und Lösungen

<u>1x Blockierungslösung (blocking solution)</u> (für <i>in situ</i> Hybridisierung)	10% Blockierungs-Stammlösung (s. u.) 0,1% Tween® 20 1x Maleinsäure-Puffer (s. u.)
<u>1x Blockierungs-Stammlösung</u> (für Blockierungslösung)	1% Blockierungsreagenz (Roche) 1x Maleinsäure-Puffer (s. u.)
<u>100x Denhardt's Lösung</u> (für Hybridisierungspuffer)	1% Ficoll® 2% Polyvinylpyrrolidon 1% BSA
<u>1x Detektionspuffer</u> (für <i>in situ</i> Hybridisierung)	0,1 M TrisHCl pH 9,5 (s. u.) 0,1 M NaCl
<u>DEPC-H₂O (H₂O RNase-frei)</u> (für <i>in situ</i> Hybridisierung)	0,1% Dimethylpyrocarbonat dest. H ₂ O
<u>10x Maleinsäure-Puffer</u> (für <i>in situ</i> -Hybridisierung)	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5
<u>4% PFA</u> (für Gewebe-Fixierung)	4% Paraformaldehyd 1x PBS (s. u.) pH 7,0
<u>10x PBS</u> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	1,4 M Natriumchlorid 0,027 M Kaliumchlorid 0,1 M di-Natriumhydrogen-phosphat

	0,018 M Kaliumdihydrogenphosphat
<u>20x SSC</u> (Natriumcitrat-Salzlösung) (für <i>in situ</i> Hybridisierung)	3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH 7,0
<u>1x TEA-Lösung</u> (für <i>in situ</i> Hybridisierung)	0,1 M Triethanolamin 0,25% Essigsäureanhydrid pH 7,5
<u>1 M Tris-HCl</u>	1 M Trizma® basisch HCl auf pH 8,0
<u>Hybridisierungspuffer/PHO-Puffer</u> (für <i>in situ</i> Hybridisierung)	1x Denhardt's Lösung 0,1 - g/ml Hering Sperma DNA 5 mg/ml Natriumpyrophosphat 5 mM Tris-HCl 4x Natriumcitrat Puffer SSC

2.1.5 Sonden und Nukleotide

Tabelle 6: Auflistung der Sonden und Nukleotide

<u>4 ng/μl oligonukleotide Sonde gegen</u> <u>HSV-1 LAT:</u> gellabelt durch - 3'DIG (5'- CAT AGA GAG CCA GGC ACA AAA ACA C - 3' ; Nukleotide 119.783 - 119.759) (Sonde nicht wirksam gegen HSV-2 LAT)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, D.
0,1 -g/ml Hering Sperma DNA	Roche, Mannheim, D.

2.1.6 Antikörper und Seren

Tabelle 7: Primäre Antikörper

<u>Maus-anti-RET01</u> ; monoklonaler Antikörper (500 µl)	Verdünnung: 1:10	Abcam, Cambridge, UK (ab1840)
<u>Ziege-anti-humanes-TrkA</u> ; polyklonaler Antikörper (15 µg/ml)	Verdünnung: 1:50	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, D. (AF175)
<u>Kaninchen-anti-neuronal nitricoxide synthase/nNOS</u> ; polyklonaler Antikörper	Verdünnung: 1:2000	Merck Millipore, Molsheim, F. (AB5380)

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper

<u>Kaninchen-anti-Maus- Immunglobuline, biotinyliert</u> ; polyklonaler Antikörper (1,3 mg/ml)	Verdünnung: 1:300	DakoCytomation, Hamburg, D.
<u>Kaninchen-anti-Ziege- Immunglobuline, biotinyliert</u> ; polyklonaler Antikörper	Verdünnung: 1:100	Abcam, Cambridge, UK
<u>Ziege-anti-Kaninchen- Immunglobuline, biotinyliert</u> ; polyklonaler Antikörper	Verdünnung: 1:100	Abcam, Cambridge, UK
<u>anti-DIG-AP, konjugierter Antikörper</u> , anti-Digoxigenin-Antikörper	Verdünnung: 1:500 Verdünnung erfolgt mit blocking solution (1 x Blockierungslösung)	Roche Diagnostics, Mannheim, D.

Tabelle 9: Weitere Antikörper

<u>Streptavidin/HRP-Komplex</u> (HRP-konjugiertes Streptavidin)	Verdünnung 1:100	BioLegend, Fell, D.
--	------------------	---------------------

Tabelle 10: Seren

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim, D.
Kaninchen-Serum (5% NRS)	DakoCytomation, Hamburg, D.
Ziegen-Serum (5% NGS)	Dako, Glostrup, Dänemark

2.1.7 Biologisches Material

Das Gewebe, das bei den Versuchen verwendet wurde, stammte aus dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München. Als Teil der Obduktion, wurde eine irreversible Anonymisierung durchgeführt. Die Arbeit mit dem menschlichen Gewebe wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität als ethisch unbedenklich eingestuft (Projekt Nummer: 017-11). Zum Todeszeitpunkt bestand bei keinem der untersuchten Personen eine floride HSV-1 Infektion.

2.2 Methoden

2.2.1 Verarbeitung des biologischen Materials

2.2.1.1 Gewebegewinnung und Gewebevorbereitung

Von insgesamt zehn humanen Individuen (siehe Tabelle 11) wurde das zu untersuchende Gewebe, die Trigeminalganglien, im Rahmen der Autopsien am Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität, München, entnommen. Die Gewebeentnahme erfolgte 10 bis 24 h *post mortem*, mit anschließender Lagerung auf Eis bzw. bei 4°C. Die Entnahme wurde von Mitarbeitern der Rechtsmedizin und von Frau Dr. rer. nat. S. Himmelein durchgeführt. Nach Einbettung in Einfriermedium (Cryo Glue, SLEE medical GmbH, Mainz, D.) erfolgte das schonende Gefrieren auf Trockeneis mit darauffolgender Lagerung bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch.

Es wurden zehn LAT positive und zehn LAT negative Ganglien von insgesamt zehn Personen verwendet.

2.2.1.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Um die geplanten Versuche durchführen zu können, musste vorerst das eingebettete, gefrorene Gewebe in dünne Schnitte überführt werden. Hierzu wurden mit dem Kryostat 10 µm dicke Schnitte aus den gefrorenen Gewebeblocks angefertigt und diese auf SuperFrost® Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, D.) aufgebracht. Die weitere Lagerung der Gefrierschnitte erfolgte bei -20°C. Die korrekten Schnittebenen wurden durch Kontrolle unter dem Lichtmikroskop nachgewiesen.

2.2.2 Immunhistochemie der Marker RET, TrkA und nNOS

Ziel dieses Versuchsabschnitts war es, die Immunhistochemie für die Markerproteine RET, TrkA und nNOS zu etablieren. Zuerst wurden die Versuchsreihen für RET, dann für TrkA und schließlich für nNOS durchgeführt. Die Versuche wurden mit jeweils unterschiedlichen Verdünnungen des Primärantikörpers ausgeführt, bis die geeignete Verdünnung gefunden wurde, die zum bestmöglichen Ergebnis führte. Die Austestung des geeigneten Verdünnungsfaktors, stellte die Voraussetzung für den immunhistochemischen Nachweis der neuronalen Marker, in der angestrebten Doppelfärbung dar.

Zuerst wurden die Gefrierschnitte für 10 min. bei Raumluft aufgetaut bzw. getrocknet. Im Anschluss daran erfolgte eine 10-minütige Trocknung bei 37°C. Im weiteren Verlauf wurde bei Raumtemperatur und auf dem Mischer gearbeitet, falls nicht anders angegeben.

Das Gewebe wurde mit 4% PFA für 10 min. fixiert, was zum einen Schutz des Gewebes gewährleisten sollte und zum anderen, eine durch zelluläre Proteasen herbeigeführte Autolyse verhindern sollte. Anschließend, erfolgte die Reinigung mit 1 x PBS (soweit nicht anders beschrieben handelte es sich jeweils um 1 x PBS in dH₂O) für jeweils 5 min in drei aufeinanderfolgenden Schritten. Danach wurden endogene Peroxidasen blockiert, um Verfälschungen durch Peroxidase bedingte Detektionssignale vorzubeugen. Dafür wurden die Schnitte für 10 min. mit 1,5% H₂O₂ in Methanol (2,5 ml 30% H₂O₂ in 47,5 ml MeOH) behandelt. Das nachfolgende Reinigen erfolgte wiederum durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS für jeweils 5 min. Um mögliche unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, kamen zum einen 5% Kaninchen-Serum (5% NRS) in 1 x PBS für die Marker RET und TrkA und zum anderen 5% Ziegen-Serum (5% NGS) in 1 x PBS für den Marker nNOS zur Anwendung. Dabei wurde das Gewebe einzeln, mit jeweils 100 µl pro Schnitt der jeweiligen Lösung befeuchtet und für 20 min in einer feuchten Kammer, die destilliertes Wasser beinhaltete, inkubiert. Ein schonendes Vorgehen war hier und bei den nachfolgenden einzelnen Befeuchtungsschritten pro Schnitt wichtig, um Gewebeerstörung zu vermeiden. Des Weiteren musste das Gewebe komplett befeuchtet werden, um Austrocknung zu vermeiden. Im nachfolgenden Schritt wurde zuerst das Serum durch Abklopfen entfernt und anschließend der Primärantikörper in der geeigneten Verdünnung aufgetragen (jeweils 100 µl pro Schnitt). Für RET (Maus-anti-RET01) wurde die geeignete Verdünnung 1:10 herangezogen, für TrkA (Ziege-anti-humanes-TrkA) 1:50 und für nNOS (Kaninchen-anti-nNOS) 1:2000. Verdünnt wurde jeweils mit 1 x PBS. Die geeigneten Verdünnungen waren im Vorfeld in Versuchen durch Anfertigung von Verdünnungsreihen etabliert worden. Des Weiteren wurden

Negativkontrollen angefertigt, die weder mit einem Primären noch mit einem Sekundären Antikörper behandelt wurden. Zudem wurden Isotypenkontrollen mit Hilfe auserwählter Antikörper angefertigt.

Die Inkubation der Schnitte erfolgte wiederum in der feuchten Kammer, diesmal für 2 h. Nach dem Einwirken der Primären Antikörper folgten wiederum drei aufeinanderfolgende Waschschritte für jeweils 5 min mit 1 x PBS. Anschließend erfolgte das Auftragen des jeweiligen biotinylierten Sekundären Antikörpers in der geeigneten Verdünnung mit jeweils 1 x PBS:

Für RET wurden Kaninchen-anti-Maus-Immunglobuline, biotinyliert in der Verdünnung 1:300 verwendet. Im Falle von TrkA, wurden Kaninchen-anti-Ziege-Immunglobuline, biotinyliert im Verhältnis 1:100 zugesetzt. Ebenso wurde das Verhältnis 1:100 bei der Immunhistochemie von nNOS mit Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulinen, biotinyliert, verwendet. Aufgetragen wurden wieder jeweils 100 µl pro Schnitt, inkubiert wurde für 30 min in der feuchten Kammer.

Im Anschluss wurden die Schnitte von den Sekundären Antikörpern gereinigt durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS für jeweils 5 min. Danach erfolgte eine weitere Inkubation für 30 min in der feuchten Kammer. Diesmal wurden die Schnitte mit jeweils 100 µl mit dem Streptavidin-HRP-Komplex in der Verdünnung 1:100 mit 1 x PBS inkubiert. Die Schnitte wurden auch hier gereinigt durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS für jeweils 5 min. Nun erfolgte die Detektion mittels DAB. Hierfür wurde zu 1 ml Substrat ein Tropfen Chromogen zugegeben, was nach Durchmischung, einzeln (100µl pro Schnitt) auf das Gewebe aufgebracht wurde. Das DAB wurde bei den Versuchen für RET und TrkA für ca. 10 min auf dem Gewebe belassen, bevor es fachgerecht entsorgt wurde. Im Falle von nNOS stellten sich ca. 3 min. als genügend heraus. Kontrolliert wurde der Vorgang des Färbens unter dem Lichtmikroskop. Die an Streptavidin gekoppelte Peroxidase (HRP) führte zusammen mit dem DAB über seine Oxidation zu einer Braunfärbung der antigenen neuronalen Zielstruktur. Um den Färbeprozess zu beenden, wurden die Schnitte in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Küvette überführt. Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung der Schnitte durch schonendes Schwenken in einer Küvette mit Hämatoxylin-Farbstoff für ca. 10 sec. Die Tatsache dass Hämatoxylin eine Affinität zu negativ geladenen Molekülen aufweist, und somit in der Lage ist, DNA zu färben, führt zu einer guten Darstellung der Nuklei. Da diese Reaktion im sauren stattfindet, mussten die Schnitte anschließend in eine Küvette mit Leitungswasser überführt werden. Durch mehrfaches und sehr vorsichtiges Waschen konnte somit der pH Wert wieder erhöht werden und eine Blaufärbung wurde gewährleistet („Blueing“). Am Ende der jeweiligen Versuche wurde das angefärbte Gewebe mit Hilfe von Glyceringelatine mit einem Deckgläschen versehen.

2.2.3 Doppelfärbung aus *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie

2.2.3.1 Erster Teil: *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von LAT

Die *in situ* Hybridisierung ist eine gängige Nachweismethode für Nukleinsäuren in Geweben. Hierbei gehen komplementäre Basenpaare eine Bindung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure ein. Es kommt also zur Hybridisierung. Die komplementären Basenpaare werden synthetisch hergestellt und als Sonde bezeichnet. Die hier verwendete oligonukleotide Sonde war mit einem Steroidhaptan, dem Digoxigenin (DIG), versehen (5'- CAT AGA GAG CCA GGC ACA AAA ACA C - 3' mit 3'DIG) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, D.). Die angewandte Sonde führt nicht zur Detektion von HSV-2-LAT.

Die Etablierung der *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von LAT war bereits im Vorfeld von Frau Dr. rer. nat. S. Himmelein durchgeführt worden. Hierdurch konnte eine Einteilung der Spender (siehe Tabelle 11) in eine LAT positive und eine LAT negative Gruppe erfolgen.

Für jeden einzelnen Marker, sollte die Doppelfärbung mindestens zweimalig durchgeführt werden, da für die nachfolgende Auswertung jeweils zwei unabhängige Versuche für die jeweiligen Marker vorliegen sollten. Um dies zu gewährleisten, wurden vorweg Versuchsreihen zur Etablierung der Doppelfärbungen durchgeführt.

Die verwendeten Gefrierschnitte wurden beliebig, also nicht in einer festen Reihenfolge, ausgewählt.

Für die Doppelfärbung wurde jeweils ein Gefrierschnitt pro Individuum (siehe Donatoren Tabelle 11) verwendet. Zusätzlich stellte ein weiterer Gefrierschnitt die Negativkontrolle dar. Als Positivkontrollen dienten Gewebeschnitte, die sich bereits im Vorfeld als LAT positiv herausgestellt hatten. Um die endogene RNA und die Hybridisierungssonde zu schützen, wurden bis zur Hybridisierung RNase freies Wasser (DEPC-H₂O) und RNase freie Puffer verwendet. Hierfür wurde Dimethylpyrocarbonat zugegeben (DEPC), was zu einer irreversiblen Inhibierung der RNasen führt, da deren aktive Zentren blockiert werden. Außerdem wurden die einzelnen Schritte, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur und auf dem Mischer durchgeführt. Während den gesamten Versuchen, wurde auf schonende Arbeitsweise geachtet, um das zu untersuchende Gewebe nicht unnötig zu strapazieren.

Die Schnitte wurden als erstes für 15 min. bei Raumtemperatur und danach für weitere 15 min. bei 50 °C getrocknet und erwärmt. Während dieser Zeit konnte die TEA Lösung vorbereitet werden: Hierfür wurde 0,745 g TEA mit 40 ml DEPC-H₂O aufgefüllt

und geschüttelt. Nun erfolgte die pH-Adjustierung mit Hilfe von HCl zur pH Wert Senkung oder NaOH zur pH Wert Erhöhung bis der Ziel-pH-Wert von 7,5 erreicht war. Die Lösung wurde auf insgesamt 50 ml mit DEPC-H₂O aufgegossen, um zu einem späteren Zeitpunkt weiterverarbeitet und gebraucht zu werden.

Nach dem vorherig erwähnten Trocknen des Gewebes, wurde dies mittels 4% PFA in DEPC für 15 min. fixiert. Das Gewebe wurde im Anschluss daran mit DEPC-H₂O zweimalig für jeweils 1 min. gewaschen. Nun wurden endogene Peroxidasen blockiert durch die 12-minütige Inkubation in einem Gemisch aus 2,5 ml H₂O₂ und 47,5 ml MeOH. Um die Schnitte von dem Peroxidaseblock zu reinigen, wurde darauffolgend mit 1 x PBS in DEPC für jeweils 5 min. dreimalig gewaschen. Zusätzlich erfolgten zwei weitere Waschschrte für jeweils 1 min. mit 2 x SSC in DEPC. Währenddessen wurde zu der vorhin hergestellten TEA Lösung 125 µl Essigsäureanhydrid zugegeben und schließlich die Schnitte in dieser Lösung für 7 min inkubiert. Diese Acetylierung sorgt dafür, dass sich die negativ geladene Sonde nicht unspezifisch an positiv geladenes Gewebe oder an den positiv geladenen Objektträger anlagert. Im darauffolgenden Schritt wurde die restliche TEA Lösung durch zweimaliges Waschen mit 2 x SSC in DEPC für jeweils 1 min. entfernt. Nun erfolgte die Prähybridisierung mit PHO Puffer, dem Hybridisierungspuffer. Auch hier wurde dem ggf. unspezifische Wirken der Sonde vorgebeugt. Dazu wurden jeweils 100 µl PHO Puffer pro Schnitt, gleichmäßig und sorgfältig auf das Gewebe verteilt, und diese bei 37°C für eine Stunde in der feuchten Kammer aufbewahrt. Nach der durchgeführten Prähybridisierung, erfolgte die eigentliche Hybridisierung. Die oligonukleotide Sonde gegen HSV-1 LAT wurde zuerst mit PHO Puffer im Verhältnis 1:250 verdünnt (4 ng/µl als gewünschte Endkonzentration). Darauffolgend, wurden jeweils 100 µl pro Schnitt dieser Lösung auf das Gewebe aufgetragen, während die Negativkontrolle nur PHO Puffer als Lösung bekam. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in der feuchten Kammer über Nacht.

Am nächsten Tag wurde der Versuch fortgeführt. Von nun an war die Verwendung von RNase freien Lösungen (DEPC) nicht mehr notwendig. Die Posthybridisierung erfolgte durch Waschen mit 2 x SSC für 10 min., dann für 10 min. mit 1 x SSC und schließlich für weitere 10 min. mit 0,1 x SSC. Durch die hier verwendeten Salzgradienten konnten nicht vollständig komplementär gebundene Hybride getrennt werden. Um das Gewebe vor unspezifischer Bindung des sekundären Antikörpers zu schützen, wurde im darauffolgenden Schritt mit der 1 x Blockierungslösung gearbeitet. Hierfür wurden für einen Versuchsdurchgang 45 ml 1 x MA Puffer mit 5 ml Blockierungslösung und 500 µl Tween20 vermischt und die Gewebeschnitte in dieser Lösung für 30 min. inkubiert. Die Sonde wurde mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, dem anti-Digoxigenin-Antikörper (Anti-DIG-AP), der selbst durch eine alkalische Phosphatase markiert war,

nachgewiesen. Die Verdünnung, die hierbei mit Blockierungslösung durchgeführt wurde, erfolgte im Verhältnis 1:500. 100 µl wurden pro Schnitt aufgetragen und für 2 h unter Verwendung der feuchten Kammer, belassen. Danach wurde mit 1 x MA Puffer für jeweils 10 min. zweimalig gewaschen, um das Gewebe von den Resten des sekundären Antikörpers zu reinigen, um schließlich im Anschluss daran, 2 min. mit 1 x Detektionspuffer behandelt zu werden. Um eine Farbreaktion zu erzeugen wurden 1500 µl 1 x Detektionspuffer mit 30 µl NBT/BCIP gemischt, und jeweils 100 µl pro Gewebeschnitt aufgetragen und in der feuchten Kammer gelagert. Wichtig war, dass sowohl die Herstellung der Lösung als auch die Inkubation in der Dunkelheit erfolgte. Die Farbreaktion wurde regelmäßig unter Verwendung des Lichtmikroskops überprüft, um sie rechtzeitig durch Überführung der Schnitte in DEPC-H₂O beenden zu können, was in der Regel nach ca. 10 bis 20 min. der Fall war.

2.2.3.2 Zweiter Teil: Immunhistochemie der neuronalen Marker

Nachdem die Schnitte nach der Farbreaktion in DEPC-H₂O überführt wurden, folgte ein einmaliger Waschschrift mit 1 x PBS für 1 min. und darauffolgend eine weitere Fixierung mittels 4 % PFA für 5 min.. Danach wurde das überschüssige 4 % PFA durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS für jeweils 5 min. entfernt. Im Anschluss daran wurde das Gewebe mit dem jeweiligen Primären Antikörper behandelt. Die geeigneten Verdünnungen wurden in den immunhistochemischen Versuchen, die vor der Doppelfärbung durchgeführt wurden, ausgetestet. Auch hier, im Rahmen der Doppelfärbungen, wurden Negativkontrollen durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden Schnitte herangezogen, die in den Einzelfärbungen bereits Marker positiv waren.

Die weiteren Schritte im Protokoll, entsprachen denen der Einzelfärbungen für die Marker RET, TrkA und nNOS (siehe 2.2.2).

2.2.4 Quantifizierungen der neuronalen Populationen

Wie bereits oben erwähnt, wurde die Doppelfärbung für die Marker, RET, TrkA und nNOS, mindestens zweimalig durchgeführt. Hierdurch wurde gewährleistet, dass der Versuch pro Marker zweifach, unabhängig voneinander, ausgewertet werden konnte.

Nach der Färbung wurden die einzelnen Neurone unter dem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt und in einer 4 Felder Tafel in Marker+/LAT+, Marker+/LAT-, Marker-/LAT+ und Marker-/LAT- eingeteilt. Zu beachten ist allerdings, dass nach den aktuellen Studien zufolge, es noch nicht komplett geklärt ist, ob sich alle LAT+ Zellen durch die *in situ* Hybridisierung nachweisen lassen oder ob sich eine gewisse Menge an Zellen der Detektion entziehen kann. Folglich bezieht sich das als hier bezeichnete LAT+ bzw. LAT- auf die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung (Held et al. 2011; Wang et al. 2005).

Auf jedem einzelnen Gewebeschnitt wurden mindestens 100 Neurone ausgezählt (zwischen 100 und 150). Somit wurden durch die zweimalige Versuchsdurchführung und Auswertung mindestens 200 Neurone pro Individuum ausgezählt. Nur Neurone, die einen sichtbaren Nukleus vorweisen konnten, wurden ausgezählt, um sicherzugehen, dass eine positive Färbung für LAT nicht übersehen wurde.

2.2.5 Größenbestimmung der Neurone

Zur Größenbestimmung wurde ein Neuronenfeld bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Ein Einschlusskriterium für die Vermessung der Neurone war der sichtbare Nukleus, da nur dann angenommen werden konnte, dass der Anschnitt durch das jeweilige Neuron in zentraler Ebene erfolgt war und somit ein annähernd maximaler Durchmesser gemessen werden konnte. Des Weiteren wurden nur Neurone vermessen, die in vollständigem Kontakt zu ihren Satellitenzellen standen, und somit komplett, in intaktem Gewebe eingebettet waren. Dadurch wurde sichergestellt, dass sowohl formveränderte Neurone als auch post-mortem zusammengefallene bzw. geschrumpfte Neurone von den Messungen ausgeschlossen wurden. Außerdem musste das Zytoplasma bis zur jeweiligen Zytomembran reichen und durfte keine Luft oder Flüssigkeitseinschlüsse vorweisen. Durch diese Einschlusskriterien konnten auch Neurone ausgemustert werden, die während der Versuchsdurchführung geschädigt worden waren. Da die strengen Einschlusskriterien, viele Neurone von der Vermessung ausgeschlossen haben und nur die besonders robusten Neurone vermessen wurden, kann das Hervorrufen eines Bias nicht ausgeschlossen werden.

Das lichtmikroskopisch eingestellte Gesichtsfeld, das das zu vermessende Neuron darstellte, wurde mit Hilfe einer Digitalkamera (Olympus Digitalkamera C-4040 Zoom)

aufgenommen und das entstandene Bild auf den PC übertragen, um die Vermessung vornehmen zu können. Hierfür wurde das Computerprogramm Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.) verwendet. Vermessen wurde die Fläche der Neurone in μm^2 . Die Errechnung der Messwerte erfolgte mit Hilfe eines imaginären Kalibrierungsgitters, bei dem die Distanz per Pixel zur Berechnung herangezogen wurde. Hierbei entsprachen 7,1423 Pixel 1 μm , dies wurde vorab berechnet und für die Vermessung festgelegt (*Einstellungen: Analyze - Set Scale - Distance in pixels: 7.1423 - Known distance: 1.00 - Unit of length: μm ; Vermessungsart: freehand selections*). Zur visuellen Darstellung der Vermessungstechnik mittels Image J siehe Abbildung 1-3.

Wie auch schon bei der Auszählung, wurde auch bei der Vermessung darauf geachtet, dass die Doppelfärbungen für die jeweiligen Marker zweimal, unabhängig voneinander ausgewertet wurden. Auch hier wurden die Neurone in Marker+/LAT+, Marker+/LAT-, Marker-/LAT+ und Marker-/LAT- eingeteilt. Da durch die strengen Einschlusskriterien viele Neurone ausgeschlossen werden mussten, wurden bei einer einzelnen Versuchsdurchführung im Durchschnitt 35,55 Neurone pro Gewebeschnitt und Marker, vermessen. Insgesamt, also bei den jeweils zweimalig durchgeführten Doppelfärbungen für die einzelnen Marker RET, TrkA und nNOS, ergab dies 2133 vermessene Neurone.

Darstellung der Vermessung mit Hilfe des Computerprogramms Image J

Abbildung 1: Programmzeile des Computerprogramms Image J.

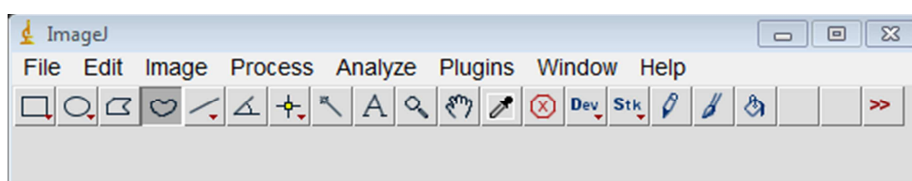


Abbildung 2: Vermessung der Fläche eines Marker positiven Neurons

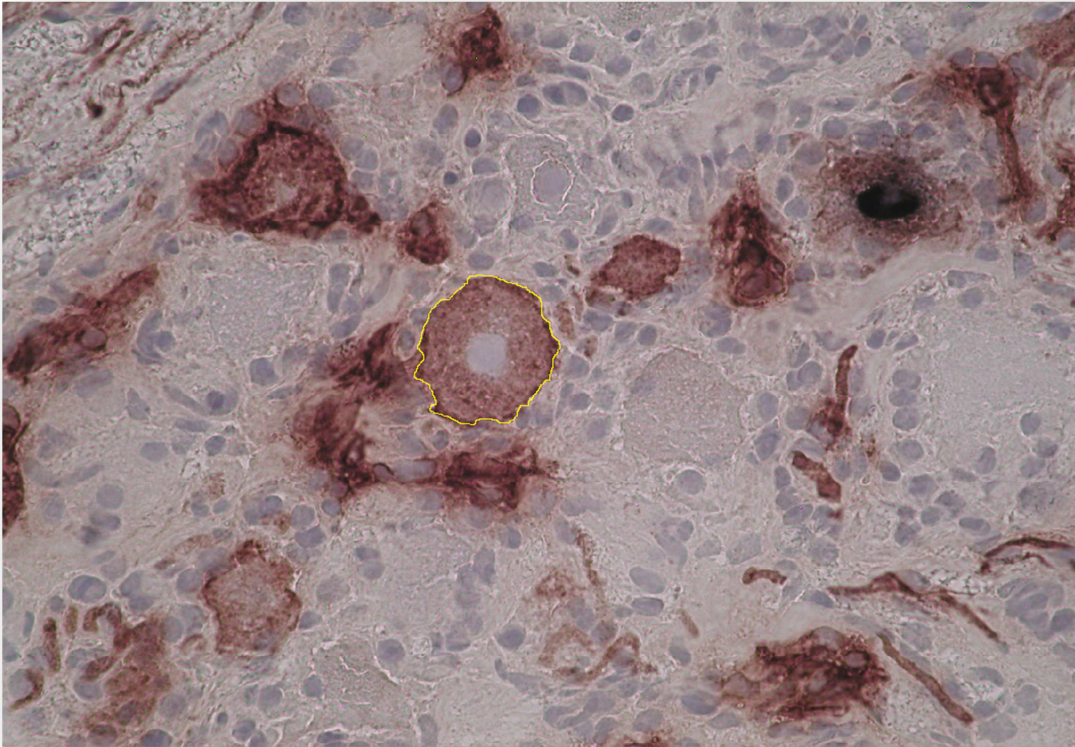
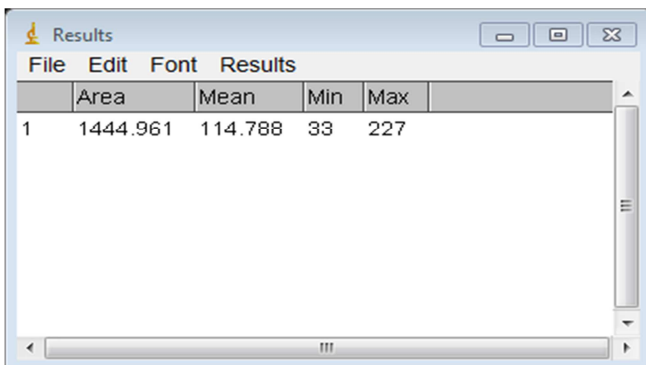


Abbildung 3: Ergebnisse der Vermessung des Neurons aus Abbildung 2.
Das verwendete Maß war die Fläche in μm^2 .



The screenshot shows a software window titled "Results" with a menu bar containing "File", "Edit", "Font", and "Results". Below the menu bar is a table with the following data:

	Area	Mean	Min	Max
1	1444.961	114.788	33	227

2.2.6 Statistik

Für die statistischen Analysen wurden die Programme Microsoft Excel und SPSS verwendet. Für die nachfolgenden Analysen wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als signifikant angesehen. Für Daten, die der Gaußschen Verteilungskurve folgten, wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM = standard error of the mean) berechnet.

Bei Verteilungen, die nicht der Gaußschen Normalverteilung folgten wurden der Median zusammen mit der 25%- und der 75%- Perzentile berechnet. Um zu untersuchen, ob bei der Gegenüberstellung der LAT+ vs. LAT- Gewebeproben (Vergleich LAT+ Gruppe vs. LAT- Gruppe), ein Unterschied zwischen der Anzahl Marker positiver Neurone besteht, wurde der zweiseitige Mann-Whitney U Test angewendet.

Die Größenunterschiede zwischen den Marker+ und den Marker- Neuronen wurden ebenfalls mit Hilfe des zweiseitigen Mann-Whitney U Tests ausgewertet. Des Weiteren wurde der zweiseitige Fisher exact Chi Quadrat Test angewandt, um die Kolo-kalisierung, von LAT mit den Markerproteinen, statistisch auszuwerten. Der Grund für die Anwendung dieses Tests war die geringe Menge an LAT+ Zellen. Zur visuellen Darstellung der Größenverhältnisse wurden Boxplot Diagramme entworfen. Zur Darstellung der prozentualen Anteile wurde mit Vier-Felder-Tafeln gearbeitet und zur Verdeutlichung Kreisdiagramme erstellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchtes Gewebe

Für die Durchführung der Versuche wurden Trigeminus Ganglien von insgesamt 10 Individuen verwendet. Der LAT-Status der Individuen wurde im Vorfeld bestimmt und war somit nicht Gegenstand dieser Arbeit. Zum einen erfolgte dies mithilfe der ISH in verschiedenen Ebenen des jeweiligen Ganglions und zum anderen durch RT-PCR Analysen, die zum selben Ergebnis führten (Theil et al. 2001). Des Weiteren waren bei der Verwendung der *nested HSV-1 DNA PCR*, die LAT+ Proben positiv und die LAT- Proben negativ (Aurelius et al. 1991). Somit war eine Einteilung der Individuen in entweder LAT+ oder LAT- möglich, also die Zuordnung zu latent infiziert oder nicht infiziert. Um beide Gruppen möglichst gleich zu gestalten, wurden fünf LAT+ und ebenso fünf LAT- Individuen ausgewählt. Bei jeder Versuchsdurchführung wurde mit diesen Individuen gearbeitet, wobei Gewebe sowohl von dem rechten als auch von dem linken TG zum Einsatz kam. Um Neurone in unterschiedlichen Ebenen untersuchen zu können, wurden die Gewebeschnitte für die einzelnen Versuche nicht in einer festen Reihenfolge, sondern beliebig, ausgesucht. Das Durchschnittsalter beim Todeszeitpunkt betrug 38 Jahre \pm 8 in der LAT negativen Gruppe und 58,4 Jahre \pm 7 (berechnet bei excel, MW & SEM) in der LAT positiven Gruppe. Die durchschnittliche *post mortem* Zeitspanne bis zur Gewebeentnahme betrug 15 h \pm 2,4 für die LAT negativen und 23 h \pm 2,3 für die LAT positiven Ganglien. Zum Todeszeitpunkt bestand bei keinem der Spender Hinweis auf eine floride HSV-1 Infektion.

Tabelle 11: Informationen zu den Spendern der Trigeminusganglien

ID	LAT Status	Geschl.	Alter bei Todeszeitpunkt in Jahren	Todesursache
1	-	M	35	Kardiale Ursache
2	-	M	29	Drogen Überdosis
3	-	W	36	Kardiale Ursache
4	-	W	20	Kardiale Ursache
5	-	W	70	Kardiale Ursache
6	+	W	78	Kardiale Ursache
7	+	M	57	Trauma
8	+	W	41	Kraniales Aneurysma
9	+	M	69	Kardiale Ursache
10	+	M	47	Kardiale Ursache

3.2 Nachweis der neuronalen Marker durch Immunhistochemie

Die Trigeminusganglien der insgesamt 10 untersuchten Individuen wurden auf insgesamt drei neuronale Markerproteine getestet. Die untersuchten Marker waren RET, TrkA und nNOS. Der Nachweis der neuronalen Marker erfolgte durch Immunhistochemie. Von den insgesamt 10 untersuchten Trigeminusganglien zeigten sich alle 10 positiv für die Marker RET, TrkA und nNOS. Folge dessen war kein getestetes Individuum Marker-. In den Abbildungen 4, 5 und 6 sind die jeweiligen Marker+ und Marker- Neurone der einzelnen neuronalen Populationen dargestellt. Die Marker+ Zellen stellen sich durch die Färbemethode braun dar.

Abbildung 4: Immunhistochemie zum Nachweis des Markers RET im humanen Ganglion trigeminale. Zu sehen sind RET+ (braun gefärbt durch DAB), gekennzeichnet durch einen Pfeil und RET- Zellen (blasslila), gekennzeichnet durch eine Pfeilspitze, bei 400-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 50 µm.

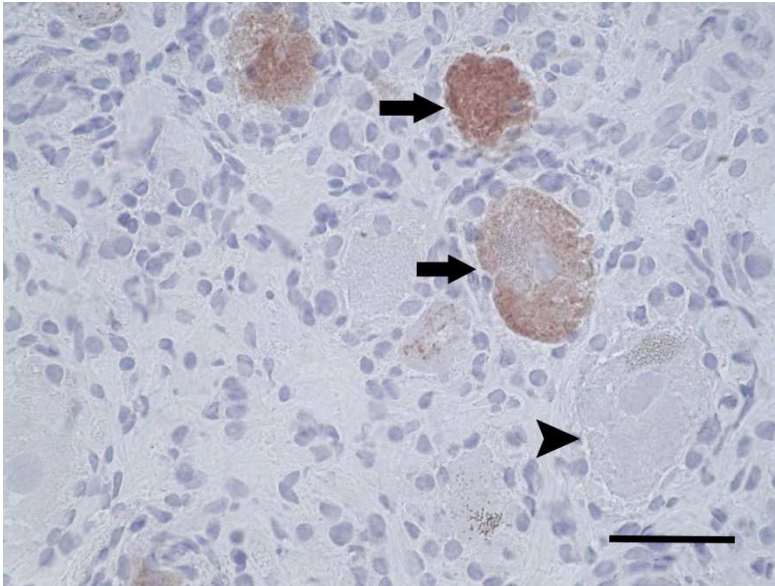


Abbildung 5: Immunhistochemie zum Nachweis des Markers TrkA im humanen Ganglion trigeminale. Zu sehen sind TrkA+ (braun gefärbt durch DAB), gekennzeichnet durch einen Pfeil und TrkA- Zellen (blasslila), gekennzeichnet durch eine Pfeilspitze, bei 400-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 50 µm.

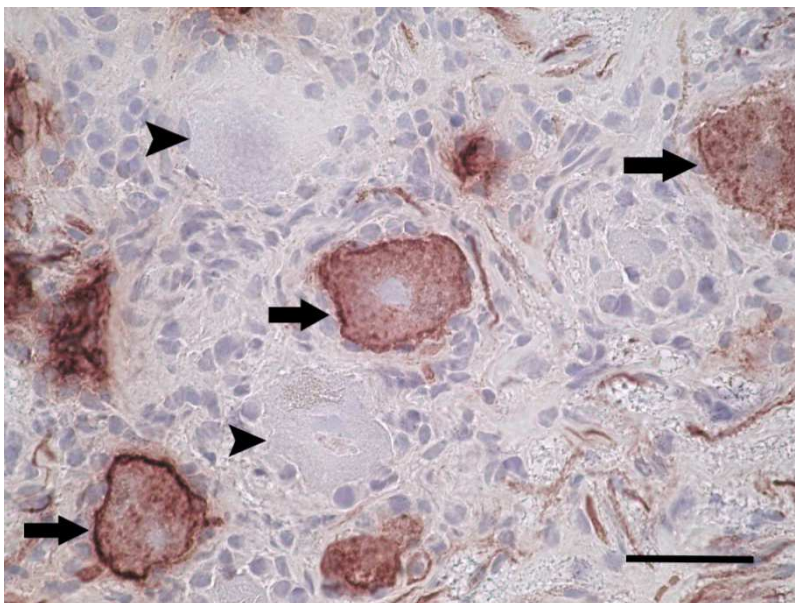
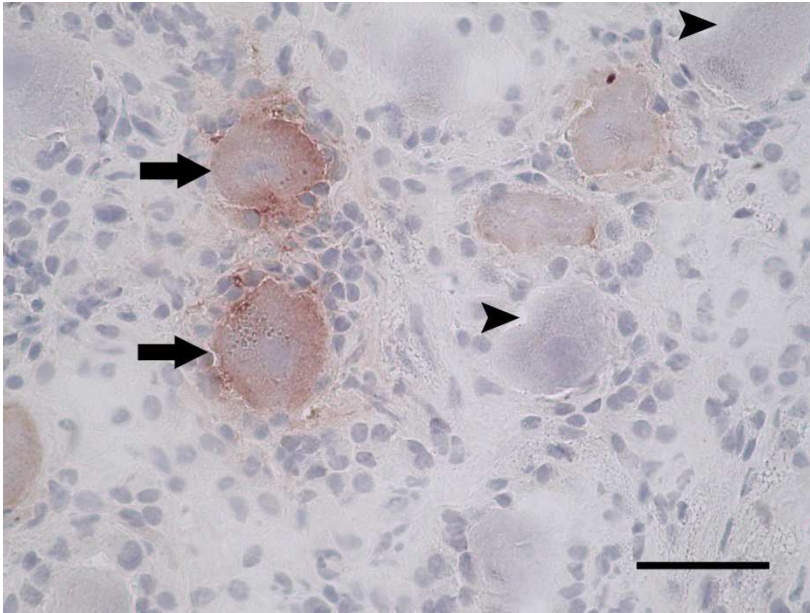


Abbildung 6: Immunhistochemie zum Nachweis des Markers nNOS im humanen Ganglion trigeminale. Zu sehen sind nNOS+ (braun gefärbt durch DAB), gekennzeichnet durch einen Pfeil und nNOS- Zellen (blasslila), gekennzeichnet durch eine Pfeilspitze, bei 400-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 50 µm.



3.3 LAT Nachweis durch *in situ* Hybridisierung

Um die LAT + Neurone mit den LAT - vergleichen zu können, wurde die In-situ-Hybridisierung, im Rahmen der Doppelfärbung durchgeführt. Hierfür wurde die Doppelfärbung für jedes Individuum (siehe Tabelle 11) im Hinblick auf den LAT-Status mindestens 6 x unabhängig voneinander durchgeführt (zweimalig bei der Doppelfärbung für RET, zweimalig bei der Doppelfärbung für TrkA, zweimalig bei der Doppelfärbung für nNOS). Hierbei waren bei jedem der Versuche die Individuen 1-5 der Tabelle 11 LAT-, während sich die Trigeminalganglien der Donatoren 6-10 jeweils LAT+ zeigten. Der LAT-Status war für jedes Individuum sowohl für das jeweils linke als auch das jeweils rechte TG gleich. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung stellten sich die LAT+ Neurone mit einem lila angefärbten Nukleus dar. Hierzu siehe Abbildung 7 und 8.

Abbildung 7: In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von LAT+ Zellen im humanen Ganglion trigeminale. Zu sehen sind LAT + (gekennzeichnet durch Stern) und LAT – (gekennzeichnet durch Pfeilspitze) Neurone, bei 400-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 50 µm.

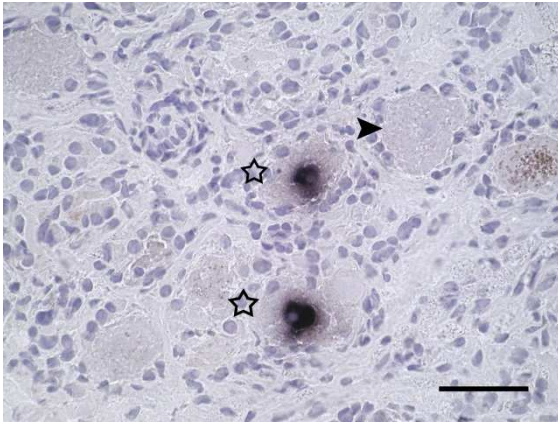
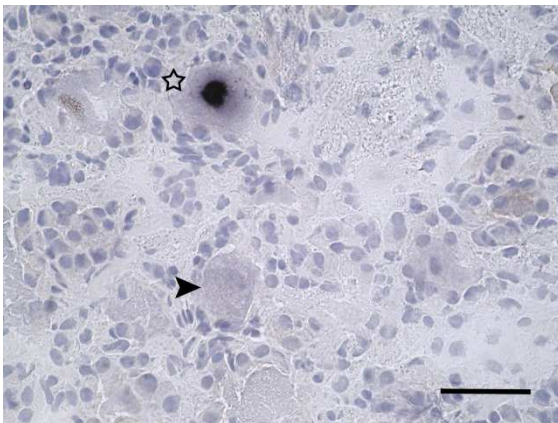


Abbildung 8: Weitere In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von LAT+ Zellen im humanen Ganglion trigeminale. Zu sehen sind LAT + (gekennzeichnet durch Stern) und LAT – (gekennzeichnet durch Pfeilspitze) Neurone, bei 400-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 50 µm.



3.4 Doppelfärbungen aus Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung

Um den Zusammenhang zwischen latent infizierten Zellen und neuronalen Populationen (RET, TrkA und nNOS) zu einem späteren Zeitpunkt zu untersuchen, wurde die Doppelfärbung pro Marker zweimalig und unabhängig voneinander

durchgeführt. Die Abbildungen 9-11 stellen lichtmikroskopische Aufnahmen des durch die Doppelfärbung markierten Gewebes dar. Die Abbildung 9 zeigt die Doppelfärbung für den Marker RET und LAT. Es folgt die Abbildung 10, die die Doppelfärbung aus TrkA und LAT darstellt. Schließlich präsentiert die Abbildung 11 die Doppelfärbung für den Marker nNOS zusammen mit LAT. Die Ergebnisse der Doppelfärbungen wurden für weitere Analysen verwendet.

Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Doppelfärbung aus Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung für LAT und den Marker RET.

Die mikroskopische Aufnahme in A zeigt bei 100-facher Vergrößerung einen Überblick im Vergleich zu den Aufnahmen B-D, welche mit 400-facher Vergrößerung einer Detailansicht dienen. Zellen, die durch einen ausgefüllten Stern gekennzeichnet sind, sind LAT+/RET+. Der transparente Stern markiert Neurone, die LAT+/RET- sind.

LAT-/RET+ Zellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet, während die Pfeilspitze LAT-/RET- Neurone darstellt. Der Maßstab beträgt 50 µm.

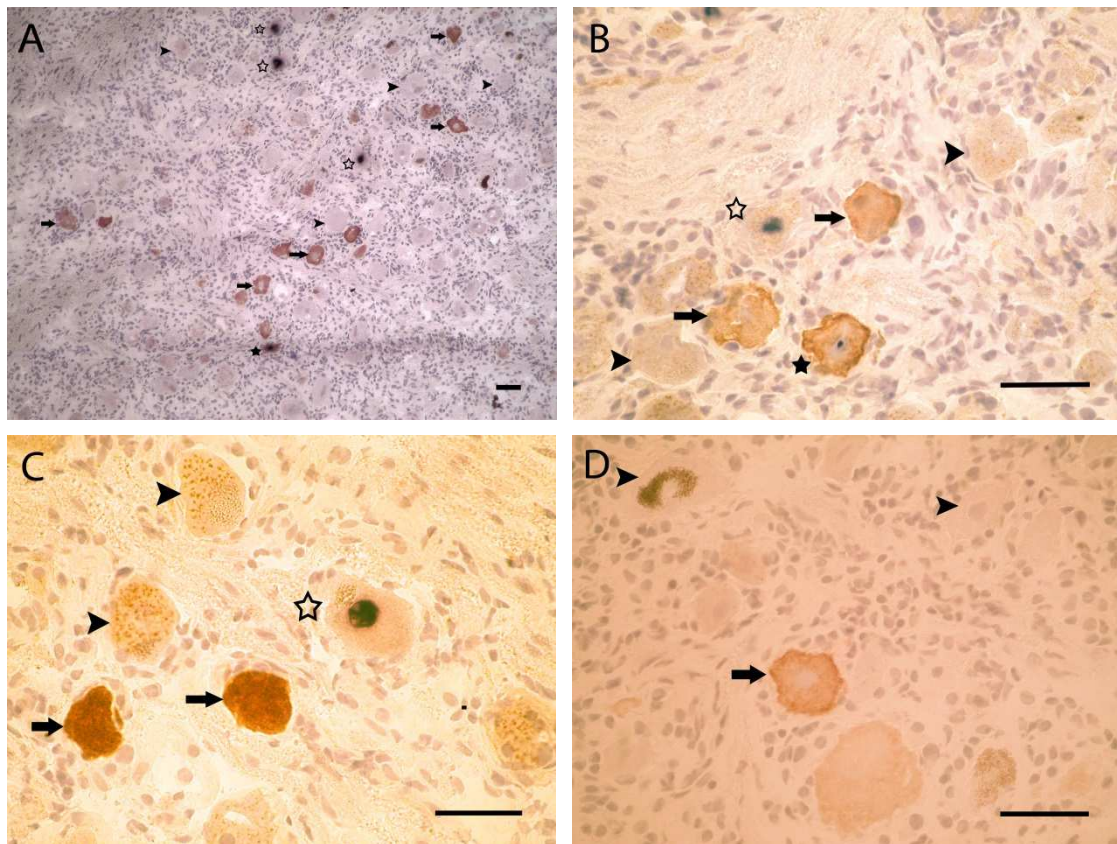


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Doppelfärbung aus Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung für LAT und den Marker TrkA.

Die mikroskopische Aufnahme in A zeigt bei 100-facher Vergrößerung einen Überblick im Vergleich zu den Aufnahmen B-D, welche mit 400-facher Vergrößerung einer Detailansicht dienen. Zellen, die durch einen ausgefüllten Stern gekennzeichnet sind, sind LAT+/TrkA+. Der transparente Stern markiert Neurone, die LAT+/TrkA- sind. LAT-/TrkA+ Zellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet, während die Pfeilspitze LAT-/TrkA- Neurone darstellt. Der Maßstab beträgt 50 µm.

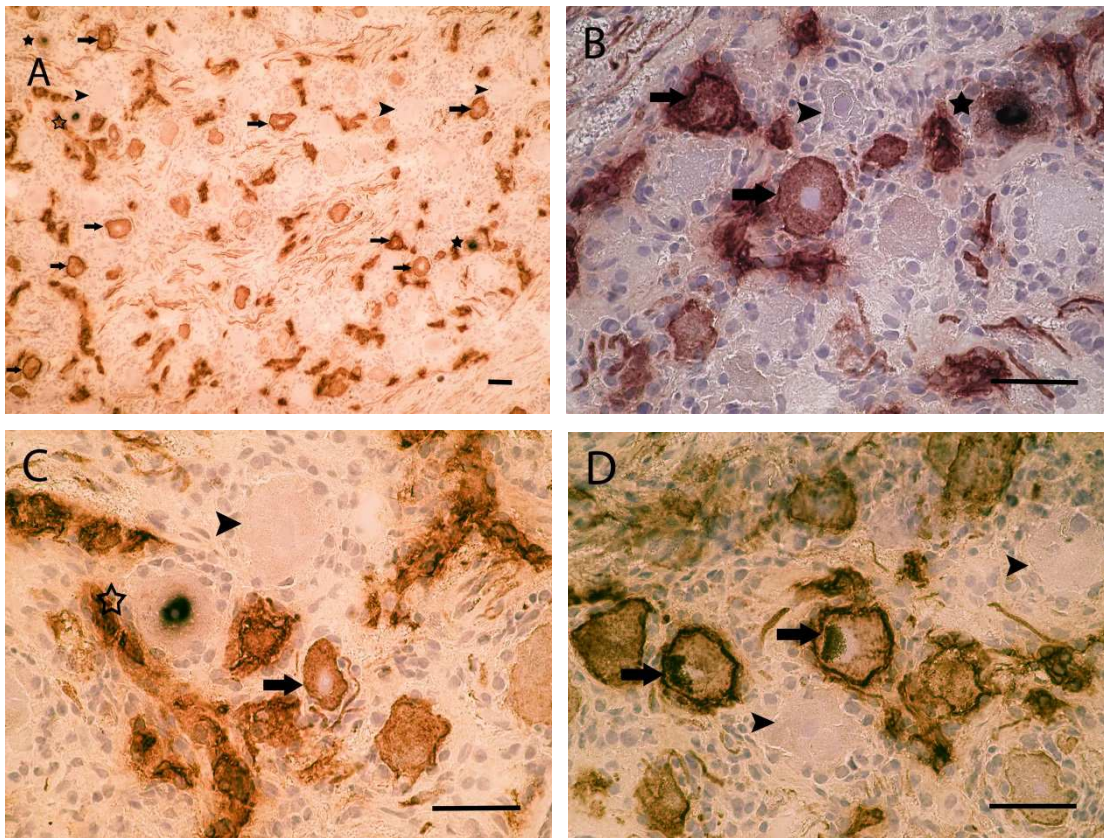
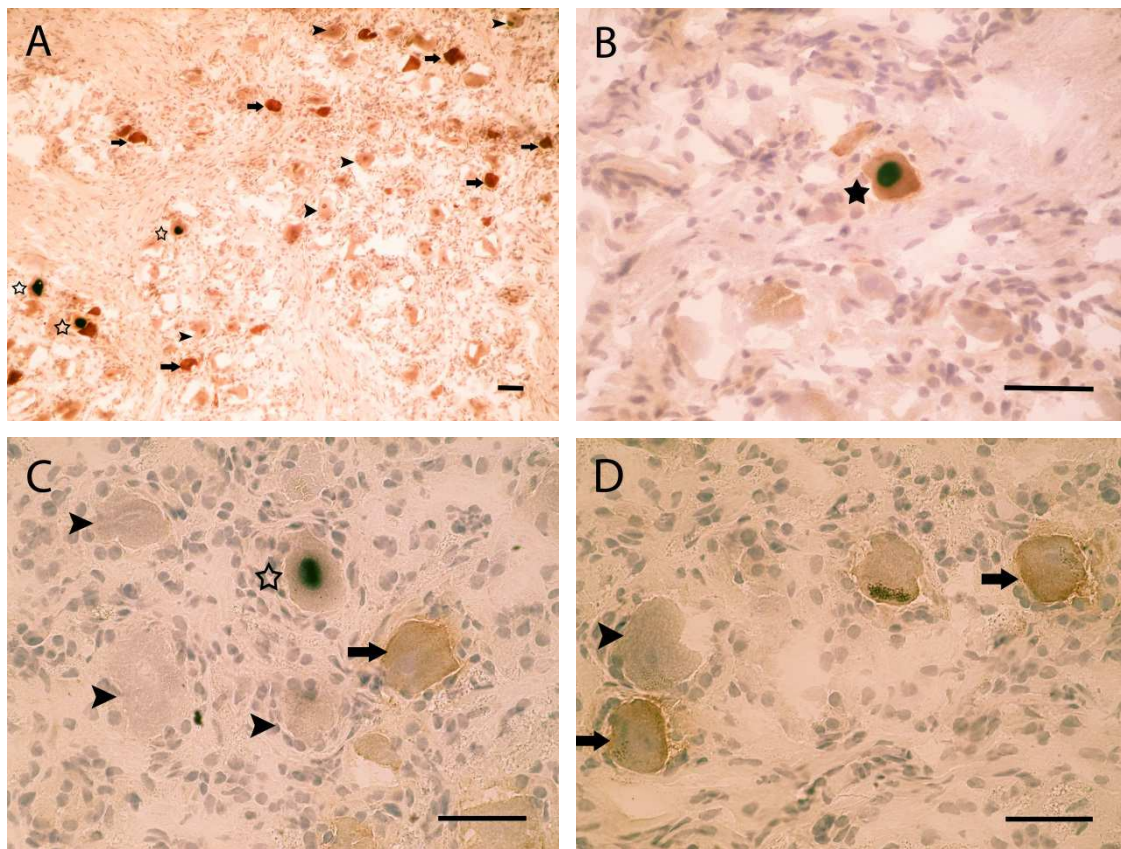


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Doppelfärbung aus Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung für LAT und den Marker nNOS.

Die mikroskopische Aufnahme in A zeigt bei 100-facher Vergrößerung einen Überblick im Vergleich zu den Aufnahmen B-D, welche mit 400-facher Vergrößerung einer Detailansicht dienen. Zellen, die durch einen ausgefüllten Stern gekennzeichnet sind, sind LAT+/nNOS+. Der transparente Stern markiert Neurone, die LAT+/nNOS- sind. LAT-/nNOS+ Zellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet, während die Pfeilspitze LAT-/nNOS- Neurone darstellt. Der Maßstab beträgt 50 µm.



3.5 Quantitative Charakterisierung neuronaler Populationen

3.5.1 Verteilung der neuronalen Marker im humanen

Ganglion trigeminale

Untersucht wurden die Gewebeschnitte der fünf LAT+ und der fünf LAT- Spender in der Doppelfärbung, somit insgesamt die Trigeminusganglien von insgesamt 10 Individuen (Tabelle 11, Spender 1-10). Die Detektion der drei Markerproteine erfolgte durch immunhistochemischen Nachweis.

Die Auswertung der Verteilung der neuronalen Marker, RET, TrkA und nNOS zeigte, dass der Wachstumsfaktor Rezeptor TrkA mit insgesamt 61,82% TrkA positiven Neuronen, den größten Anteil unter den untersuchten Markern einnahm. Der immunhistochemische Nachweis für nNOS zeigte, dass im Durchschnitt 33,13% der Neurone des Ganglion Trigeminale, Marker+ waren. Der geringste Prozentsatz an Marker+ Neuronen war bei dem *GDNF family ligand* Rezeptor RET, mit 26,93% zu verzeichnen. Die hohe Verteilung der einzelnen Marker lässt annehmen, dass es teils zu Überlappungen zwischen den einzelnen Markern kommt.

Um zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der Markerverteilung zwischen LAT+ und LAT- Personen gibt, wurden die ausgezählten Marker positiven Zellen der LAT+ Gruppe denen der LAT- Gruppe gegenüber gestellt. Für die Marker RET, TrkA und nNOS zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen LAT+ und LAT- Personen ($p > 0,05$ beim zwei-seitigen Mann-Whitney U Test, für alle untersuchten Ganglien).

3.5.2 Quantitative Bestimmung der LAT+ Neurone

Für die Analyse der Häufigkeiten für LAT+ und LAT- Neurone wurden die fünf als LAT+ charakterisierten Individuen (siehe Tabelle 11, Spender 6-10) untersucht. Nach der LAT In-situ-Hybridisierung zeigten sich bei jedem der untersuchten Trigeminusganglien sowohl LAT+ als auch LAT- Neurone. Diese wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Bezüglich des Vorliegens der LAT+ Neurone ergaben sich $5,10\% \pm 0,396\%$ (Mittelwert \pm Standardfehler). Somit zeigten, gemäß In-situ-Hybridisierung, im Durchschnitt 5,10 % der untersuchten Neurone eine latente Infektion mit HSV-1.

3.5.3 Quantitativer Zusammenhang aus Marker und LAT

Weiter sollte untersucht werden, ob durch das HSV-1 latent infizierte Neurone mit gewissen neuronalen Populationen einhergehen oder diese Populationen meiden. Hierfür wurden die Trigeminalganglien der Individuen der als LAT+ bezeichneten Gruppe (Spender 6-10 der Tabelle 11) in der Doppelfärbung sowohl zum Nachweis von LAT als auch für ein ausgewähltes Markerprotein angefärbt. Die drei zu untersuchenden Marker waren RET, TrkA und nNOS. Der Nachweis von LAT+ Zellen erfolgte durch In-situ-Hybridisierung, während der jeweilige Marker im zweiten Schritt der Doppelfärbung mittels Immunhistochemie angefärbt wurde. Die Gewebeschnitte wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop untersucht und die einzelnen Neurone ausgezählt und in die zugehörige Kategorie eingetragen: Hierfür gab es vier Möglichkeiten, nämlich die Zugehörigkeit des jeweiligen Neurons zu LAT+ mit Marker+ oder Marker- bzw. LAT- mit entweder Marker+ oder Marker-. Es erfolgte somit die Zuteilung der Neurone in eine Vier-Felder-Tafel. Für die prozentuale Verteilung der Kolokalisierung des Versuchsaufbaus RET/LAT siehe Tabelle 12 und Abbildung 12. Die Ergebnisse für die Versuchsreihe TrkA/LAT sind in Tabelle 13 und Abbildung 13 dargestellt. Die prozentuale Verteilung der Neurone aus der Doppelfärbung nNOS/LAT werden in Tabelle 14 und Abbildung 14 visualisiert.

Außerdem wurde untersucht, wie der Zusammenhang, zwischen dem Status für LAT und der Verteilung der jeweiligen Markerproteine ist. Hierfür wurden die LAT+ Neurone mit den LAT- verglichen, in Bezug auf das Vorkommen des jeweiligen Markers.

Die Fragestellung beinhaltete somit, ob LAT+ Neurone im Vergleich zu LAT- Neuronen gleichzeitig einhergehen mit einem positiven oder negativen Status für den jeweiligen Marker. Hierfür wurde der *Fisher's exact chi - square Test* durchgeführt.

Im Falle des Markerproteins RET, zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,516) zwischen dem Prozentsatz der Marker+ Zellen bei einerseits LAT+ und andererseits LAT- Zellen. Somit zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den latent infizierte Neuronen und den nicht infizierten Zellen in Bezug auf die neuronale Population mit dem Charakteristikum RET.

Anders zeigten sich die Ergebnisse für die Marker TrkA und nNOS. Bei diesen beiden Markerproteinen waren signifikante Unterschiede zu verzeichnen (p-Wert für TrkA = <0,001; p-Wert für nNOS = 0,0054). LAT- Zellen waren häufiger Marker+. Während ein LAT+ Zustand bevorzugt mit einem Marker- Status für TrkA und nNOS einherging.

Tabelle 12: Vier Felder Tafel zur Darstellung der prozentualen Einteilung der ausgezählten Neurone aus der Doppelfärbung für den Marker RET und LAT *^p

	RET+	RET-	
LAT +	0,96%	3,39%	4,35%
LAT-	25,50%	70,15%	95,65%
	26,46%	73,54%	100%

*: Gesamtanzahl der ausgewerteten Neurone betrug 1149

^p: der mit dem Fisher's exact χ^2 Test berechnete p-Wert betrug 0,516. Ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant gewertet.

Abbildung 12: Diagrammdarstellung der prozentualen Verteilung der Kolo-kalisierung von LAT \pm und RET \pm

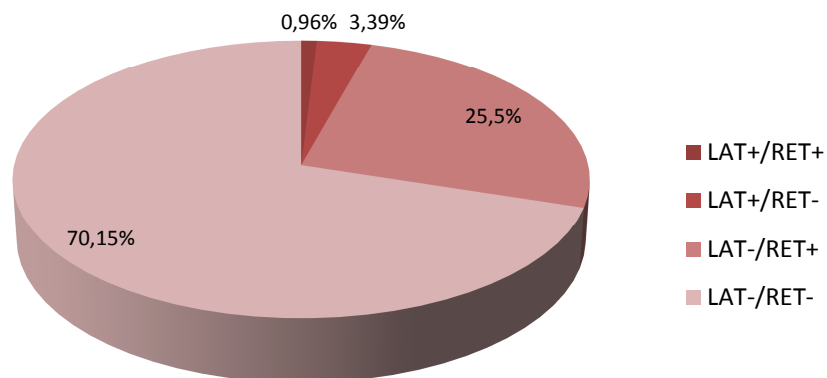


Tabelle 13: Vier Felder Tafel zur Darstellung der prozentualen Einteilung der ausgezählten Neurone aus der Doppelfärbung für den Marker TrkA und LAT *^p

	TrkA+	TrkA-	
LAT+	1,87%	3,82%	5,69%
LAT-	54,91%	39,40%	94,31%
	56,78%	43,22%	100%

*: Gesamtanzahl der ausgewerteten Neurone betrug 1231

^p: der mit dem Fisher's exact Chi² Test berechnete p-Wert war <0,001. Ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant gewertet.

Abbildung 13: Diagrammdarstellung der prozentualen Verteilung der Kolo-kalisierung von LAT ± und TrkA ±

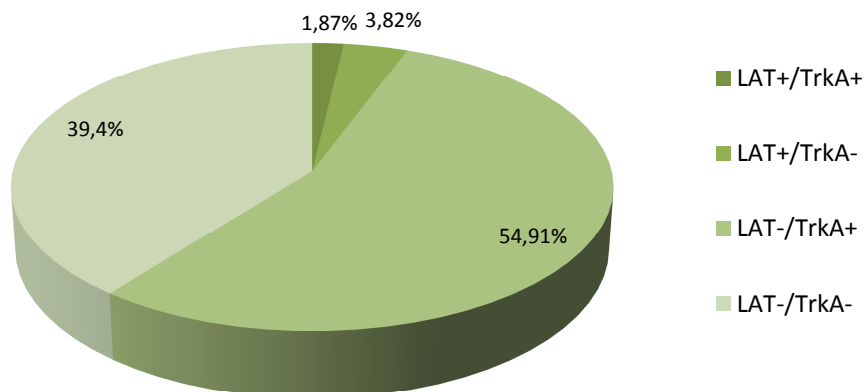


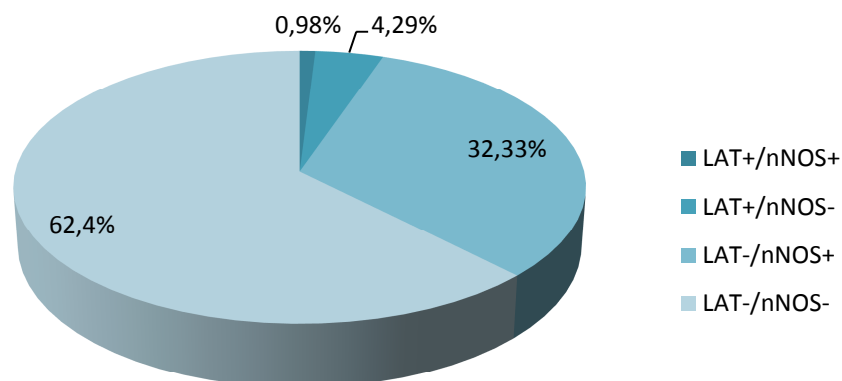
Tabelle 14: Vier Felder Tafel zur Darstellung der prozentualen Einteilung der ausgezählten Neurone aus der Doppelfärbung für den Marker nNOS und LAT *^p

	nNOS+	nNOS -	
LAT+	0,98%	4,29%	5,27%
LAT-	32,33%	62,40%	94,73%
	33,31%	66,69%	100%

*: Gesamtanzahl der ausgewerteten Neurone betrug 1423

^p: der mit dem Fisher's exact Chi² Test berechnete p-Wert betrug 0,0054. Ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant gewertet.

Abbildung 14: Diagrammdarstellung der prozentualen Verteilung der Kolo-kalisierung von LAT ± und nNOS ±



3.6 Charakterisierung der Größenverhältnisse

Für einen generellen Überblick der einzelnen Größen steht die Tabelle 15 zur Verfügung, die Median, unteres Quantil, oberes Quantil, Minimum und Maximum für die einzelnen Populationen und deren Eigenschaften angibt. Zur visuellen Darstellung der Vermessungstechnik siehe Abbildung 1-3. In Bezug auf die Größe zeigt sich insgesamt ein großer Überschneidungsbereich zwischen den einzelnen Neuronenpopulationen.

3.6.1 Größenverhältnisse der neuronalen Populationen

Um die nachgewiesenen neuronalen Populationen weiter charakterisieren zu können, wurde die Größe der einzelnen Neurone bestimmt. Vermessen wurde die Fläche in μm^2 . Die Neurone der LAT+ Spender wurden in vier Kategorien unterteilt: LAT+/Marker+, LAT+/Marker-, LAT-/Marker+ und LAT-/Marker-. Bei den LAT- Individuen erfolgte die Einteilung in Marker+ und Marker- Neurone.

Ziel war es, zu untersuchen ob Marker+ und Marker- Neurone in der Größe differieren. Insgesamt wurden 2133 Neurone vermessen. Der Median der Fläche aller gemessenen Neurone, also der sowohl Marker+ als auch Marker- Neurone aller Experimente, lag bei $1162,27 \mu\text{m}^2$. Das untere Quantil und das obere Quantil lagen für die Gesamtzahl der Neurone bei $870,44 \mu\text{m}^2$ und bei $1518,69 \mu\text{m}^2$ (siehe Tabelle 15). Bei den durchgeführten Doppelfärbungen für den Marker RET wurden insgesamt 642 Neurone vermessen. Davon waren 263 Neurone Marker+ und 379 Marker-. Der Median der RET+ Zellen betrug $1073,78 \mu\text{m}^2$, bei einem unteren Quantil von $842,57 \mu\text{m}^2$ und einem oberen Quantil von $1401,71 \mu\text{m}^2$. Im Vergleich dazu, war bei den RET- Zellen ein Median von $1193,53 \mu\text{m}^2$ zu verzeichnen, bei einem unteren Quantil von $955,25 \mu\text{m}^2$ und einem oberen von $1541,88 \mu\text{m}^2$. Der *2-tailed Mann-Whitney U Test* zeigte, dass die Neurone, die den Marker RET exprimierten signifikant kleiner waren, als die Marker- Neurone ($p < 0.001$).

Um auch die Population des Markers TrkA genauer zu untersuchen, wurden auch hier die einzelnen Neurone vermessen und wiederum Marker+ und Marker- Neurone in Vergleich gesetzt. Bei den Versuchsreihen für den Marker TrkA wurden insgesamt die Flächen von 795 Neuronen vermessen. Davon waren 523 Neurone Marker+ und 272 Neurone Marker- für TrkA. Die Berechnung des Medians für TrkA+ Zellen ergab den Wert $1029,06 \mu\text{m}^2$, wobei das 1. und das 3. Quantil die Werte $774,09 \mu\text{m}^2$ und $1352,44 \mu\text{m}^2$ einnahmen. Für die TrkA- Neurone wurde der Median $1426,49 \mu\text{m}^2$ berechnet. Das 1. und das 3. Quantil lagen hier bei $995,20 \mu\text{m}^2$ bzw. bei $1709,51 \mu\text{m}^2$. Auch für

den Marker TrkA zeigte sich eine Signifikanz bezogen auf die Größenverhältnisse der Neurone. TrkA+ Neurone waren signifikant kleiner als TrkA- Neurone ($p < 0,001$ im *2-tailed Mann Whitney U Test*).

Die Vermessungen wurden auch für die Neurone des Markerproteins nNOS durchgeführt. Auch hierfür, wurden die Neurone der Doppelfärbung ausgewertet (Vergleich Marker+ mit Marker-, unabhängig von LAT-Status). Insgesamt wurden 696 Neurone mit Hilfe von Image J vermessen. Dabei waren 306 der vermessenen Neurone positiv für den Marker nNOS, während 390 negativ waren. Der Median für die Fläche der nNOS+ Neurone lag bei $1011,77 \mu\text{m}^2$. Das untere Quantil und das obere Quantil wurden mit $766,13 \mu\text{m}^2$ und $1279,08 \mu\text{m}^2$ berechnet. Die Analyse der nNOS- Neurone ergab einen Median von $1358,69 \mu\text{m}^2$. Das 1. und das 3. Quantil ergaben für die Auswertung der nNOS- Neurone $1054,14 \mu\text{m}^2$ bzw. $1785,53 \mu\text{m}^2$. Der Vergleich der nNOS+ mit den nNOS- Neuronen ergab auch hier, dass die Marker+ Neurone signifikant kleiner waren, als die Marker- ($p < 0,001$ beim *2-tailed Mann-Whitney U Test*).

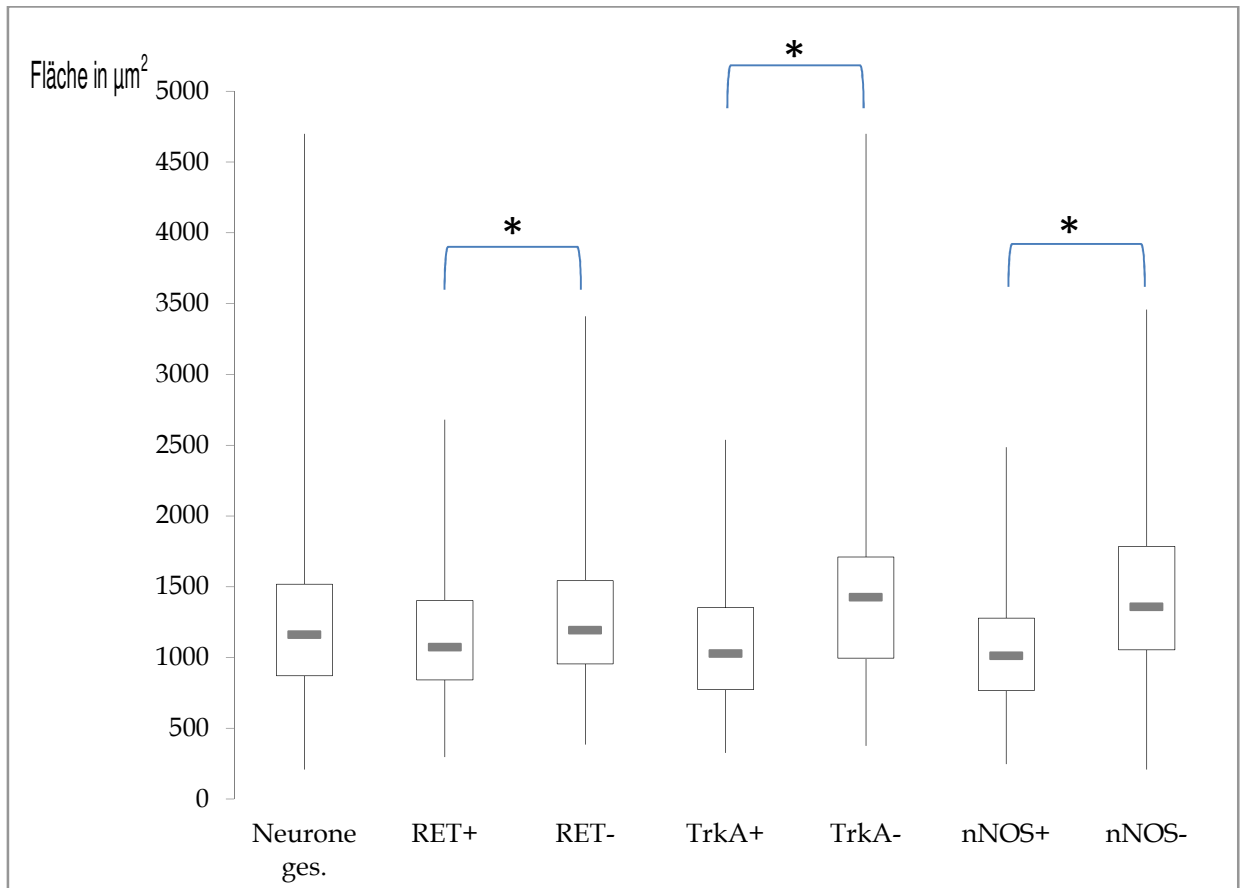
Somit zeigt sich, dass die Marker+ Zellen (für RET, TrkA und nNOS) signifikant kleiner sind, als die Marker- Neurone. Eine Übersicht der vermessenen bzw. berechneten Werte bietet Tabelle 15. Zur visuellen Darstellung steht das Boxplot Diagramm (Abbildung 15) zur Verfügung, das die neuronalen Populationen (aufgeteilt in Marker+ und Marker-) und die vermessenen Neurone insgesamt darstellt.

Tabelle 15: Die ermittelten Werte der Größen für die neuronalen Populationen RET (RET+ im Vergleich zu RET-), TrkA (TrkA+ im Vergleich zu TrkA-) und nNOS (nNOS+ im Vergleich zu nNOS-). Ebenso die Werte der Größen für die Gesamtanzahl der vermessenen Neurone. Die Werte entsprechen der jeweiligen Fläche in μm^2 .

Bezeichnung	Oberes Quantil	Maximum	Minimum	Unteres Quantil	Median	Anzahl vermessener Neurone
Neurone ges.	1518,69	4699,52	209,22	870,44	1162,27	2133
RET+	1401,71	2681,05	297,38	842,57	1073,78	263
RET-	1541,88	3410,66	383,85	955,25	1193,53	379
TrkA+	1352,44	2538,28	325,74	774,09	1029,06	523
TrkA-	1709,51	4699,52	376,58	995,2	1426,49	272
nNOS+	1279,08	2484,96	245,8	766,13	1011,77	306
nNOS-	1785,53	3457,69	209,22	1054,14	1358,69	390

Abbildung 15: Boxplots zur Darstellung der Größe der einzelnen neuronalen Populationen und der vermessenen Neurone insgesamt im Vergleich. Die y-Achse repräsentiert die Fläche in μm^2 . Der Strich innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Box wird durch das obere und untere Quantil begrenzt. Der Stern steht für den signifikanten Unterschied

(* = $p < 0,001$, 2-tailed Mann-Whitney U Test).



3.6.2 Größenverhältnisse der LAT+ und LAT- Neurone

Ein weiteres Ziel bestand darin, die latent infizierten Neurone (LAT+) mit den nicht latent infizierten (LAT-) in Bezug auf deren Größe zu vergleichen. Hierfür wurde wiederum mit dem Computerprogramm Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.) gearbeitet und die Flächen in μm^2 der entweder LAT+ oder LAT- Neurone berechnet (siehe Abbildung 1-3). Für diese Auswertung wurde die Gruppe der LAT+ Individuen herangezogen. Die Anzahl der LAT+ Neurone insgesamt lag bei 269. Der Median der Flächen der LAT+ Neurone wurde mit $1073,78 \mu\text{m}^2$ berechnet. Das untere und das obere Quantil betrugen hierbei $786,81 \mu\text{m}^2$ bzw. $1397,37 \mu\text{m}^2$.

Im Vergleich dazu, wurden die Größen der LAT- Neurone der jeweils gleichen Individuen ermittelt. Insgesamt wurde die Fläche von insgesamt 789 LAT- Zellen vermessen. Der Median lag hierbei für die LAT- Neurone bei $1137,84 \mu\text{m}^2$, mit dem 1. Quantil von $868,98 \mu\text{m}^2$ und dem 3. Quantil von $1533,29 \mu\text{m}^2$ (siehe Tabelle 16).

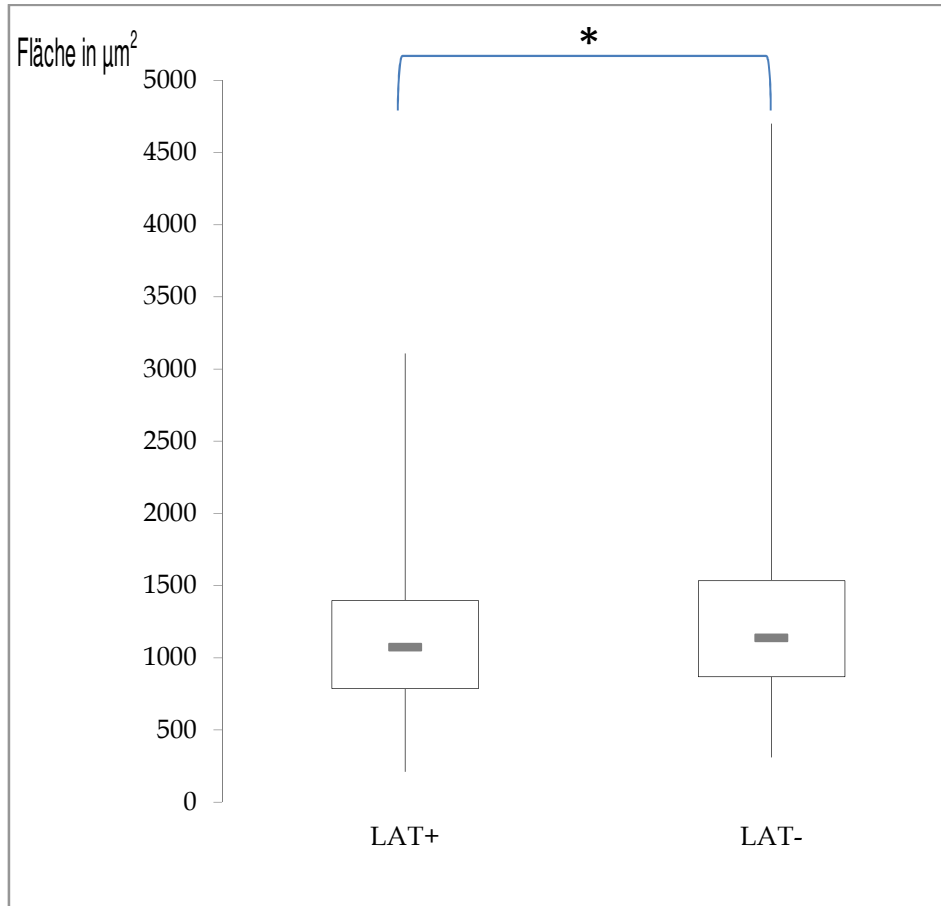
Ein signifikanter Unterschied zwischen den Größenverhältnissen von zum einen LAT+ Neuronen und zum anderen LAT- konnte mit einem p-Wert $< 0,01$ im *2-tailed Mann-Whitney U Test* gezeigt werden. Somit präsentieren sich LAT+ Neurone signifikant kleiner als LAT- Neurone. Zur Darstellung der Größenverhältnisse wurde ein Boxplot Diagramm entworfen (siehe Abbildung 16).

Der Vergleich der medianen Größe von LAT+ Zellen mit den Größen der Neurone der Marker RET, TrkA und nNOS zeigte, dass die LAT+ Zellen den gleichen Wert für den Median aufwiesen wie die RET+ Neurone ($1073,78 \mu\text{m}^2$). Für die Marker TrkA und nNOS waren die Mediane der Flächen jeweils kleiner als bei den LAT+ Zellen (TrkA $1029,063 \mu\text{m}^2$ und nNOS $1011,77 \mu\text{m}^2$).

Tabelle 16: Die ermittelten Werte der Größen für die LAT+ und LAT- Neurone im Vergleich. Die Werte entsprechen der jeweiligen Fläche in μm^2 .

Bezeichnung	Oberes Quantil	Maximum	Minimum	Unteres Quantil	Median	Anzahl vermessener Neurone
LAT+	1397,37	3108,93	209,22	786,81	1073,78	269
LAT-	1533,29	4699,52	310,38	868,98	1137,84	789

Abbildung 16: Boxplots zur Darstellung der Größen von LAT+ und LAT- Neuronen im Vergleich. Die y-Achse repräsentiert die Fläche in μm^2 . Der Strich innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Box wird durch das obere und untere Quantil begrenzt. Der Stern steht für den signifikanten Unterschied (* = $p < 0,01$, 2-tailed Mann-Whitney U Test).



4 DISKUSSION

Die wichtigsten Erkenntnisse der aktuellen Arbeit sind:

- 1.) Die neuronalen Marker RET, TrkA und nNOS können im humanen TG nachgewiesen werden und eignen sich somit zur Charakterisierung neuronaler Populationen des humanen Ganglion trigeminale.
- 2.) Im humanen Ganglion trigeminale ergibt sich im Hinblick auf die prozentualen Anteile folgende absteigende Reihenfolge: TrkA, nNOS und RET.
- 3.) Im humanen Ganglion trigeminale sind die Marker RET, TrkA und nNOS (Marker Angabe in absteigender Reihenfolge in Bezug auf die Größe) vornehmlich in mittelgroßen Neuronen anzufinden. Die Marker Eigenschaften können bei einer Vielzahl von Zellen nachgewiesen werden, hierbei vermehrt in kleinen als in großen Zellen. Ebenso verhält es sich mit LAT+ Zellen. Die Marker+ Zellen zeigten sich signifikant kleiner als die Marker-. Auch LAT+ Neurone stellten sich signifikant kleiner dar, als LAT-.
- 4.) Der Anteil der doppeltpositiven Neurone, also zugleich LAT+ und Marker+, war für den Marker TrkA am höchsten. Darauffolgend bei dem Marker RET und schließlich am geringsten für den Marker nNOS.
- 5.) LAT+ Zellen sind signifikant seltener, als per Zufall erwartet, positiv für die Marker TrkA und nNOS. Für den Marker RET war keine signifikante Präferenz zu verzeichnen.

Interpretation der TrkA Ergebnisse:

Mit 61,82% stellte die TrkA positive Population die dominanteste der untersuchten neuronalen Populationen dar. Diese Population war bei diesen Untersuchungen häufiger vertreten, als in anderen Studien am humanen Ganglion trigeminale. So ergaben sich beispielsweise Werte für TrkA positive Neurone, im humanen TG von Individuen im Erwachsenenalter, von 34,61%, 2,60% und 6,22% (Quartu, Setzu, and Del Fiaccio 1996; Quartu, Geic, and Del Fiaccio 1997). Die 61,82% TrkA positiven Neurone lagen zugleich unterhalb der im DRG der Ratte nachgewiesenen Marker positiven Zellen. Hier konnte ein Wert von 70% TrkA immunopositiven Neuronen verzeichnet werden. 37% dieser TrkA+ Neurone zeigten eine intensivere immunhistochemische Färbung (Fang et al. 2005). In einer weiteren Studie am DRG der Ratte, lag der TrkA positive Anteil bei 40% (Averill et al. 1995). Der Median der Fläche der TrkA positiven Neurone betrug $1029,06 \mu\text{m}^2$ und lag somit unter dem Wert der TrkA negativen Neurone ($1426,49 \mu\text{m}^2$). Außerdem ist zu bemerken, dass die TrkA+ Zellen im Durchschnitt kleiner waren, als der Durchschnitt der gemessenen Neurone insgesamt, der bei $1162,27 \mu\text{m}^2$ lag. Bezogen auf die Einteilung der

Neuronengröße (siehe 1.2.1), ist die Mehrzahl der TrkA positiven Zellen dieser Studie im unteren Bereich der mittelgroßen Zellen anzuordnen. Zellen von sowohl kleiner als auch großer Größe wurden ebenfalls detektiert. Der Median der TrkA+ Zellen kann mit Ergebnissen der Flächenbestimmung TrkA positiver Neurone anderer Studien verglichen werden. In anderen Untersuchungen konnten beim menschlichen Ganglion trigeminale ähnliche Größenverhältnisse für TrkA positive Neurone verzeichnet werden: So wurde ein Flächendurchschnitt von $1384,12 \mu\text{m}^2$ im humanen TG für das Erwachsenenalter berechnet. Allerdings wurden hierbei Neurone von nur einem Individuum betrachtet und immunhistochemisch wurde auf den NGF getestet. Dieser Wert ist, verglichen mit dieser Studie, ungefähr im Bereich des oberen Quantils anzuordnen ($1352,44 \mu\text{m}^2$). In jüngeren Jahren zeigten sich in der vorherig erwähnten Studie, vornehmlich kleinere Flächenmaße bei den NGF positiven Zellen (Quartu, Geic, and Del Fiocco 1997). Im TG der Ratte konnte TrkA v.a. in kleinen und mittelgroßen Neuronen nachgewiesen werden, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit steht (Gaspersic et al. 2007). Auch im DRG der Ratte, waren die meisten TrkA positiven Neurone von der Größe her klein (77% der TrkA+ Neurone) (Fang et al. 2005; Averill et al. 1995). Es konnten hier aber auch TrkA+ Neurone bei mittelgroßen und großen neuronalen Populationen beobachtet werden (Fang et al. 2005).

Interpretation der nNOS Ergebnisse:

Mit einem prozentualen Anteil von 33,13% lag der Wert für nNOS positive Neurone unter dem Anteil TrkA positiver und über dem Anteil RET positiver Neurone. Beim Vergleich der Größe der untersuchten Marker, lag der Median für nNOS positive Neurone mit $1011,77 \mu\text{m}^2$ unter den Werten für TrkA und RET. Der Median lag ebenfalls im unteren Bereich der mittelgroßen Zellen. Für das Flächenmaß nNOS positiver Zellen konnte gezeigt werden, dass diese im Durchschnitt kleiner sind, als nNOS negative Zellen ($1358,69 \mu\text{m}^2$) und sich ebenfalls kleiner als die durchschnittlichen Neurone insgesamt ($1162,27 \mu\text{m}^2$) darstellen. In einer anderen Studie am humanen Ganglion trigeminale konnte ein nNOS Gesamtanteil von 50% detektiert werden. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Gruppen, zeigten die großen Zellen mit 69% den höchsten prozentualen Anteil an nNOS+ Zellen. Die Untersuchung der mittelgroßen Zellen, ergab einen nNOS positiven Anteil von 56%, während der geringste Anteil, mit 48%, bei den Zellen mit kleinem Durchmesser nachgewiesen werden konnte. Somit waren die Neurone mit großem Durchmesser am häufigsten immunopositiv für nNOS. Diese zeigten allerdings im Vergleich zu den kleinen und mittelgroßen Neuronen eine weniger intensive Färbung (Borsani et al.

2010). Eine weitere Studie am humanen TG kam zu dem Ergebnis, dass 15% der Neurone immunoreaktiv sind (Tajti et al. 1999). Eine andere Arbeit am humanen TG ergab indirekt einen Anteil von 35%, was dem Ergebnis dieser Studie am nächsten kommt (Hou et al. 2003). Schließlich lag der Anteil der nNOS immunopositiven Neurone bei einer weiteren Studie bei 18% im humanen TG (Gottanka, Kirch, and Tamm 2005). Eine erhöhte Dichte der positiven Neurone konnte im ophthalmischen Gebiet des TGs nachgewiesen werden (Nozaki et al. 1993; Lazarov 2002). Die variierenden Ergebnisse im humanen Ganglion trigeminale, könnten in den verschiedenen Fixationsschritten der Protokolle begründet sein. Zudem ist die Sensitivität der Primärantikörper häufig unterschiedlich. Schließlich könnten die geringeren nNOS Anteile durch die schwächere Färbungsintensität der großen Neurone bedingt sein, da diese ggf. unter bestimmten Bedingungen nicht detektiert wurden. Bei Untersuchungen des TGs der Katze, wurden nNOS immunoreaktive Zellkörper in einem gemäßigten Anteil (genauer Wert nicht angegeben) nachgewiesen. Diese zeigten sich v.a. in kleinen und mittelgroßen Zellen (Edvinsson et al. 1998). Auch bei Untersuchungen des TGs der Ratte, bei der zur Identifizierung der immunoreaktiven Zellen, der selektive Marker NADPH-d (nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat-diaphorase) herangezogen wurde, konnte gezeigt werden, dass kleine und mittelgroße Zellen eine intensivere Färbung aufweisen. Hier konnten ungefähr die Hälfte der Zellen als positiv gewertet werden, wobei die dominierenden Neurone einen eher kleineren Durchmesser aufwiesen. Gerade diese Tatsache führte zu der Annahme, dass nNOS bei der Transmission von Schmerz beteiligt sein könnte, da diese Neurone vornehmlich Nozizeptoren sind (Stoyanova and Lazarov 2005). Das Ganglion Trigeminal der Maus hatte mit nur 3 % einen geringen Anteil an nNOS positiven Neuronen (Yang, Voytek, and Margolis 2000). Ein Grund für die unterschiedlichen Anteile nNOS positiver Neurone, könnte die Herkunft der Trigeminalganglien sein und somit von der jeweiligen Spezies abhängigen. Jedoch stellte sich beim Vergleich der DRG von Mensch und Ratte, keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der nNOS Verteilung dar (Terenghi et al. 1993).

Interpretation der RET Ergebnisse:

Den kleinsten prozentualen Anteil ergab der Marker RET mit 26,93%. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien. So konnten z.B. 23,23% RET positive Neurone in einem humanen TG eines Erwachsenen nachgewiesen werden (Quartu et al. 2006). Diese Prozentzahl passt zu dem Ergebnis dieser Arbeit. Im Gegensatz dazu lag der Anteil der RET positiven Neurone im murinen DRG bei 61,9% und somit höher als bei den humanen TGs (Molliver et al. 1997). Diese Unterschiede

könnten zum einen in der Herkunft der untersuchten Ganglien, also human oder murin, begründet sein. Zum anderen scheint es, dass die morphologische Zusammensetzung der sensorischen Ganglien je nach Körpergebiet variiert.

Die Größenuntersuchung der RET positiven Zellen ergab einen Median von 1073,78 μm^2 . Von den in dieser Studie untersuchten Markern, lag dieser Median oberhalb der Werte für TrkA und nNOS. Die RET positiven Zellen waren im Durchschnitt kleiner als die RET negativen, die einen Median von 1193,53 μm^2 aufwiesen. Zudem lag die durchschnittliche Größe der RET+ Neurone unter dem Median der gesamt vermessenen Neurone (1162,27 μm^2). In einer Studie, bei der u.a. die Größe RET+ Neurone des humanen TGs näher untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass der Flächendurchmesser im Alter zunimmt und dass beim Erwachsenen 75% der RET positiven Neurone entweder zu den kleinen oder mittelgroßen Neuronen zählen, während die anderen 25% der Gruppe der Zellen mit großem Durchmesser angehören (Quartu et al. 2006). Dies passt zu dem Ergebnis dieser Studie, bei der die RET positiven Zellen sich vornehmlich bei den mittelgroßen Zellen einordnen. Der Durchmesser der RET positiven Zellen des humanen TGs betrug, in der vorhin erwähnten Studie, im Durchschnitt 30,49 μm (Flächen = 730,14 μm^2) und ist somit im Bereich des unteren Quantils für RET+ Zellen in dieser Studie anzuordnen. Zu beachten ist hierbei, dass bei der gerade zum Vergleich stehenden Studie, nur ein einzelnes Individuum untersucht wurde und diese somit diesbezüglich eingeschränkt repräsentativ ist (Quartu et al. 2006). Bei Untersuchungen des DRGs im Mausmodell, zeigte RET bezüglich der Neuronengröße keine eindeutige Präferenz. Zwar wiesen RET+ Neurone häufig einen kleinen Durchmesser auf, kamen jedoch auch in großzelligen Populationen vor. In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass RET während der murinen Entwicklung im DRG hochreguliert wird. Während der Embryonalperiode nahm der prozentuale Anteil der RET+ Neurone auf <15% zu. Im Gegensatz zu den TrkA+ Neuronen zu diesem Lebenszeitpunkt, waren die RET+ Zellen vornehmlich von großer Größe, während TrkA bereits in diesem jungen Alter, v.a. in kleinen und mittelgroßen Neuronen nachweisbar war (Molliver et al. 1997; Molliver and Snider 1997; Franck et al. 2011). Die RET exprimierenden großen Zellen, differenzierten sich im weiteren Verlauf zu niederschwelligen Mechanorezeptoren (Bourane et al. 2009; Luo et al. 2009; Franck et al. 2011). Während der Embryonalentwicklung begann die Differenzierung der kleinen und mittelgroßen nicht-peptidergen Neurone erst nach der Entwicklung der größeren Zellen. Zu den kleinen unmyelinisierten Neuronen gehören auch die sich entwickelnden Nozizeptoren (Franck et al. 2011; Chen et al. 2006; Marmigere et al. 2006). Im murinen DRG konnten RET+ Neurone in jeglicher Somatagröße nachgewiesen werden. Die Aufführung der

prozentualen Verteilung erfolgte jedoch nicht. Es konnte hier allerdings gezeigt werden, dass erwachsene RET-Knockout Mäuse einen 33%-igen Verlust an Neuronen aufwiesen. Zudem zeigte sich, dass die Somafläche um 39% abnahm. Somit konnte angenommen werden, dass RET am trophischen Erhalt der Nervenzellen beteiligt ist (Golden et al. 2010). Wie bereits ersichtlich, liegen mehrere Studien zu RET im DRG der Maus vor. Dagegen nur wenige, die die Verteilung von RET im humanen TG untersucht haben. Diese Arbeit zeigt, dass die RET positiven Neurone im humanen TG gehäuft in Neuronen mittlerer Größe vorkommen, aber auch in kleinen und großen Zellen angetroffen werden können.

Interpretation der LAT Ergebnisse:

Der Nachweis der latenten Infektion mit HSV-1, gelang durch LAT, welches durch die In-situ-Hybridisierung zur Darstellung kam. Es muss jedoch bedacht werden, dass es noch fraglich ist, ob durch die ISH alle latent infizierten Zellen des humanen TGs erfasst werden können. Die Eventualität, dass geringste Mengen von LAT durch diese Methode nicht detektiert werden könnten, kann derzeit noch nicht komplett ausgeschlossen werden. Außerdem ist noch nicht eindeutig geklärt, ob alle latent infizierten Zellen LAT exprimieren (Held et al. 2011; Wang et al. 2005; Arbusow et al. 2010). Im Rahmen dieser Studie stellte sich der Anteil der LAT+ Neurone des humanen TGs mit 5,10% dar. In der Literatur wurde der Anteil der LAT+ Neurone im humanen TG indirekt mit 1,28% aufgeführt und lag somit unter dem Anteil der LAT+ Neurone dieser Studie (Held et al. 2011). Die Tatsache, dass bei der Untersuchung in dieser Studie ein höherer Wert erzielt wurde, könnte darin begründet sein, dass die Dichte der LAT+ Zellen zwischen den einzelnen infizierten Individuen schwanken könnte. Da die untersuchten Individuen natürlich nicht übereinstimmten, könnte dies zu dem Unterschied geführt haben. Doch beide Werte weisen darauf hin, dass der Anteil der LAT+ Neurone im humanen TG einen geringen Anteil der Gesamtneurone einnimmt. Werden die einzelnen trigeminalen Äste betrachtet, so zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen sowohl LAT+ Zellen als auch zytotoxischer T-Zellen im Bereich des Nervus maxillaris (V2) und des Nervus mandibularis (V3), wohingegen ein geringerer Anteil im Bereich des Nervus ophthalmicus (V1) nachgewiesen werden konnte. Dies steht im Zusammenhang mit dem klinischen Reaktivierungsmuster (Hufner et al. 2009).

Bei der Untersuchung der Größenverhältnisse für LAT+ Zellen ergab sich ein Median von $1073,78 \mu\text{m}^2$. Somit zeigten sich LAT+ Zellen signifikant kleiner als LAT-, die einen Wert von $1137,84 \mu\text{m}^2$ im Durchschnitt aufwiesen. Auch waren diese kleiner als der Median der Neurone insgesamt, der mit $1162,27 \mu\text{m}^2$ vermessen wurde. Wie bereits

bei den vorhin beschriebenen Marker kam LAT bevorzugt in mittelgroßen Zellen vor und siedelte sich hier im unteren Bereich an. Der Median der Größe für LAT positive Zellen zeigte sich identisch mit dem der RET+ Zellen, der ebenso einen Wert von 1073,78 μm^2 aufwies. In der Literatur konnten keine Werte zum Größenverhältnis LAT+ Zellen im Ganglion trigeminale zum Vergleich herangezogen werden. Dies ist die erste Studie, die die Größenverhältnisse LAT+ und LAT- Neurone untersucht hat.

Interpretation der Ergebnisse der Kolo-kalisierung aus Markerprotein und LAT:

Bei der Untersuchung der Kolo-kalisierung der neuronalen Markerproteine zusammen mit LAT, konnte gezeigt werden, dass prinzipiell jede der untersuchten Population das latente Virus beherbergen kann. Dies ist in Einklang zu bringen, mit Studien am Tiermodell, wo ebenfalls gezeigt werden konnte, dass LAT mit verschiedenen neuronalen Populationen einhergehen kann (Yang, Voytek, and Margolis 2000). Es galt zu untersuchen, wie häufig eine Kolo-kalisierung per Zufall zu erwarten ist.

Der Anteil der doppelt positiv gefärbten Neurone lag für den Marker TrkA am höchsten. Somit zeigten sich hier 1,87% sowohl LAT als auch TrkA+, bei insgesamt 5,69% LAT positiven Zellen. An zweiter Stelle reihten sich die LAT+/RET+ Neurone ein, mit einem prozentualen Wert von 0,96% bei einer Gesamtmenge von LAT+ Zellen von 4,35%. Schließlich lag der Anteil sowohl LAT+ als auch nNOS+ Neurone, in Bezug auf die Gesamtzahl LAT+ Neurone (5,27%), am niedrigsten, mit 0,98%. Die Interpretation der gerade genannten Reihenfolge bezieht sich auf die Gesamtmenge LAT+ Zellen, und nicht auf die absolute Menge (rein prozentual gesehen, lag der Anteil LAT+/nNOS+ Zellen mit 0,98% höher als der, der LAT+/RET+ Zellen mit 0,96%). Wie erwartet, waren die prozentualen Werte der LAT+/Marker+ Zellen eher niedrig, da zum einen bedacht werden muss, dass der Anteil der LAT+ Neurone im Durchschnitt nur 5,10% ausmachte und die jeweiligen Marker ebenso nur zu einem gewissen Prozentsatz nachzuweisen waren. Die Kombination aus beiden, also LAT+ und zugleich Marker+ konnte somit keine prozentualen hohen Zahlen hervorbringen.

Bei der Analyse, ob LAT positive im Vergleich zu LAT negativen Zellen bevorzugt mit einem positiven Markerstatus einhergehen, konnte gezeigt werden, dass für den Marker RET kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war. Dies bedeutet, dass es keinen signifikanten Unterschied gab, zwischen der Eigenschaft RET+ in der LAT+ Gruppe im Vergleich zu der Verteilung RET+ Neurone in der LAT- Gruppe. Es ist daher anzunehmen, dass die Eigenschaft RET weder einen schützenden noch einen fördernden Einfluss auf die latente Virusinfektion hat, da LAT weder häufiger noch seltener in RET+ Zellen vorkommt.

Anders verhielt es sich mit den Markern TrkA und nNOS, bei denen statistisch signifikante Unterschiede, zwischen der LAT+ und LAT- Gruppe, bezüglich der jeweiligen Markerverteilung verzeichnet werden konnten. So waren weniger LAT+ Neurone auch gleichzeitig Marker+, für zum einem TrkA und zum anderen nNOS. Umgekehrt zeigten sich LAT- Neurone vermehrt zugleich Marker+. Somit geht eine latent infizierte Zelle, weniger einher mit einem positiven Nachweis für die Markerproteine TrkA und nNOS. Folglich sind TrkA- und nNOS- Zellen bevorzugt latent infiziert. LAT wird somit eher in Marker- Zellen exprimiert. Im Falle des Markers nNOS, könnte der Grund dafür in der Tatsache liegen, dass die Bildung von NO einen potentiellen antiviralen Effekt im Tiermodell aufwies und die Replikation von HSV-1 gehemmt wurde (Yang, Voytek, and Margolis 2000; Croen 1993; Komatsu, Bi, and Reiss 1996; Reiss and Komatsu 1998). Passend dazu, waren im ophthalmischen Bereich des TGs vermehrt nNOS+ Neurone nachzuweisen, ein Bereich, der im Vergleich zu anderen Regionen im humanen TG, weniger latent infizierte Neurone aufweist (Lazarov 2002; Hufner et al. 2009).

Für keinen der untersuchten Markerproteine konnte eine positive Korrelation zwischen LAT und dem Marker detektiert werden. Der Grund dafür könnte sein, dass LAT eine bestimmte neuronale Population bevorzugen könnte, die in dieser Studie durch die verwendeten Markerproteine nicht erfasst wurde. Alternativ, könnte es sich auch um eine neuronale Population handeln, die sich durch eine Kombination aus mehreren Marker Eigenschaften auszeichnen könnte. Weitere Ergebnisse, bezüglich dieser Hypothese, sind in unserem Paper aufgeführt (Flowerdew et al. 2013). Weitere Forschungsansätze zu dieser Fragestellung, könnten in Zukunft folgen.

Vergleich zum Tiermodell:

Diese Studie gehört zu den wenigen, die Markerproteine des humanen Ganglion trigeminale untersucht hat. Bisher wurde vornehmlich am Tiermodell gearbeitet. Somit stellt diese Arbeit eine der wenigen dar, die die unterschiedlichen Eigenschaften des Ganglion trigeminale des Menschen näher untersucht hat.

Betrachtet man die Verteilung der LAT+ Neurone in Bezug auf die neuronalen Marker, so liefert das Mausmodell im Vergleich zum humanen Ganglion trigeminale andere Ergebnisse: So konnte gezeigt werden, dass A5+ Neurone, die in hohem Maße mit einem TrkA+ Status einhergehen, anfälliger für eine latente Infektion mit HSV-1 waren als andere. Somit waren Neurone mit den phänotypischen Merkmalen SSEA3+, A5+ und TrkA+ vermehrt latent infiziert. Im Vergleich dazu, zeigten sich bei der Maus, KH10+ Neurone, die sich durch eine hohe Kolo-kalisierung mit RET auszeichnen, weniger häufig latent infiziert. Im Mausmodell, waren KH10+ Neurone vermehrt

assoziiert mit einer produktiven Infektion mit HSV-1. Für den Marker b-NOS (entspricht nNOS) zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede. Auch im DRG wurden vergleichbare Beobachtungen bei der Maus gemacht (Yang, Voytek, and Margolis 2000; Dodd and Jessell 1985; Margolis et al. 2007; Bertke et al. 2011). Die Unterschiede zwischen Maus und Mensch, könnten zum einen darin begründet sein, dass die Verteilung der untersuchten Marker zwischen den einzelnen Spezies variieren könnte. Zum anderen, könnten Wirtsfaktoren ihren Einfluss walten lassen, wie beispielsweise unterschiedliche immunologische Gegebenheiten. Zudem muss beachtet werden, dass die Infektion der Maus im Modell anders vonstattengeht, als die natürliche Infektion beim Menschen. Während hier die Infektion über die orale Mukosa in den Körper dringt, wird die Maus auf okularem Wege infiziert. Da unterschiedliche neuronale Populationen diese Bereiche innervieren könnten, könnte dies ein weiterer Einflussfaktor auf die unterschiedlichen Ergebnisse sein (Hilliges et al. 1996). Die Tatsache, dass es bei der HSV-1 Reaktivierung zu unterschiedlichen Krankheitsbildern kommen kann, wie beispielsweise Herpes labialis, Fazialisparese, Neuritis vestibularis und HSV-1 Enzephalitis, lässt vermuten, dass dies zum einen mit der unterschiedlichen Verteilung des HSV-1 zusammenhängt und zum anderen der Einfluss der diversen neuronalen Populationen eine wichtige Rolle spielt (Hufner et al. 2009; Flowerdew et al. 2013).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das humanpathogene Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1), das zu den Alpha-Herpesviren gehört, führt nach der Primärinfektion zu einer latenten Infektion sensorischer Neurone des Ganglion trigeminale (TG). Von hier aus kann es unter gewissen Umständen zu einer Reaktivierung kommen. Begünstigende Faktoren für eine Reaktivierung sind physische und psychische Stresssituationen sowie Immunsuppression. Die Reaktivierung manifestiert sich durch unterschiedliche Krankheitsbilder: Während Herpes labialis in der Regel einen eher sachten Verlauf hat, stellt die HSV-1 Enzephalitis eine lebensbedrohliche Erkrankung dar. Weitere Reaktivierungsformen können z.B. die Herpes keratitis sein, die zu den Hauptursachen für Erblindung weltweit zählt, die Fazialisparese, die Neuritis vestibularis und viszerale Infektionen bei immunsupprimierten Patienten.

Während des Latenzzustandes von HSV-1 findet, im Gegensatz zur produktiven Infektion, eine limitierte Genexpression statt. Das Latenz-assoziierte-Transkript (LAT) ist für diesen Zustand typisch und wird darum als Nachweis der latenten Infektion in der Forschung herangezogen. Die Tatsache, dass nur ein geringer Anteil der Neurone im humanen TG eine positive Reaktion für LAT zeigt, lässt vermuten, dass die Eigenschaften der einzelnen neuronalen Populationen einen wichtigen Einfluss auf das latente Infektionsverhalten des Virus haben könnten. Die grundlegende Fragestellung dieser Arbeit bestand darin, neuronale Populationen im humanen TG zu charakterisieren. Daraufgehend sollte eine Verbindung zu der latenten HSV-1 Infektion geschaffen werden, um den Einfluss und die Empfänglichkeit der jeweiligen Wirtszellen vermehrt aufzuklären.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden neuronale Populationen des humanen TGs näher charakterisiert. Hierfür wurden Neurone mit Hilfe immunhistochemischer Nachweismethoden auf die *GDNF-Family Ligand* Rezeptor Tyrosin Kinase RET, die NGF Rezeptor Tyrosin Kinase A TrkA und die neuronale Stickstoffmonoxid Synthase nNOS untersucht. Die Auswertung des prozentualen Vorhandenseins der einzelnen Marker ergab, dass der größte Anteil mit 61,82% durch TrkA positive Neurone gebildet wurde, gefolgt von nNOS mit 33,13% und schließlich RET mit 26,93% positiven Neuronen. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Größenverhältnisse der Zellen im humanen TG bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass sich bevorzugt Neurone mittlerer Größe durch die Marker RET, TrkA und nNOS auszeichnen. Die Marker positiven Zellen waren bei allen drei untersuchten Markerproteinen signifikant kleiner als Marker negative.

Im zweiten Teil dieser Studie, wurden die Neurone des humanen TGs in einer Doppelfärbung, bestehend aus In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von LAT und Immunhistochemie zum Nachweis des jeweiligen Markers (RET, TrkA oder nNOS) im Hinblick auf die latente Virusinfektion charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass LAT+ Neurone signifikant weniger, als per Zufall erwartet, mit einem Marker positiven Zustand für TrkA und nNOS einhergehen. Somit zeigte sich die latente Infektion mit HSV-1 vermehrt in TrkA und nNOS negativen Neuronen. Im Umkehrschluss zeigten sich TrkA positive und nNOS positive Neurone resistenter gegenüber der latenten Virusinfektion. Für den Marker RET konnte keine signifikante Präferenz nachgewiesen werden. Somit besteht zwischen latent infizierten Neuronen und nicht infizierten, kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Eigenschaft RET. Schließlich wurde die Bestimmung der Größenverhältnisse der LAT positiven im Vergleich zu den LAT negativen Zellen durchgeführt. Hierbei konnte wie bereits bei den neuronalen Markern gezeigt werden, dass die LAT+ Zellen signifikant kleiner sind, als die LAT- und primär Neurone mittlerer Größe befallen werden. Jedoch können Neurone mit kleinem und großem Durchmesser ebenfalls latent infiziert sein.

Durch die vorliegende Arbeit ist es zum einen gelungen das humane Trigeminusganglion bezogen auf dessen neuronale Zusammensetzung näher zu charakterisieren, und zum anderen eine Verbindung zur latenten HSV-1 Infektion zu schaffen, im Hinblick auf das bevorzugte neuronale Befallsmuster des Virus, um dadurch zur Charakterisierung latent infizierter und nicht infizierter Zellen beizutragen. Das Verständnis für das Virus auf der einen Seite und zugleich das Verständnis für die Charakteristika der befallenen Zellen auf der anderen Seite, gehen Hand in Hand und sind Voraussetzung für die Entwicklung künftiger Therapieansätze.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
-	negativ
+	positiv
A5	lactoseries glycoconjugates erkannt durch den monoklonalen Antikörper A5
Abb.	Abbildung
ATF3	Activating transcription factor 3
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
anti-DIG-AP	Anti-Digoxigenin-Antikörper
ARTN	Artemin
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CB	Calbindin D-28k
CCK	Cholecystokinin
CCR5	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CXCR3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3
D.	Deutschland
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
DEPC-H ₂ O	mit Dimethylpyrocarbonat versetztes Wasser
dest.	destilliert
dH ₂ O	destilliertes Wasser

DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOR	delta Opioid Rezeptor
DRG	Spinalganglion (dorsal root ganglion)
E	early
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-gene	early-gene
eNOS	endotheliale NO Synthase
g	Gramm
GAL	Galanin
gB	Glykoprotein B
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
Geschl.	Geschlecht
GFL	GDNF Family Ligands
GFR α	GDNF Family Receptor α
GG	Ganglion geniculatum
ggf.	gegebenenfalls
Glu	Glutamat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HHV	Humanes Herpesvirus
HSE	Herpes Simplex Encephalitis
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ 1
HSV-2	Herpes Simplex Virus Typ 2
IB4	Isolectin B4

ICP	Infected Cell Protein
ID	Identifikationsnummer
IE	immediate early
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare (inducible) NO Synthase
IP-10	Interferon-gamma induced protein 10 kD
ISH	In-situ-Hybridisierung
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KH10	lactoseries glycoconjugates erkannt durch den monoklonalen Antikörper KH10
L	late
LAT	Latenz-assoziiertes-Transkript
LAT-	LAT negativ
LAT+	LAT positiv
LLC	large light cell
M	Molar
M	Männlich
MA	Maleinsäure
Marker-	Marker negativ
Marker+	Marker positiv
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min.	Minuten
ml	Milliliter

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTN	mesencephalic trigeminal nucleus / Nucleus mesencephalicus nervi trigemini
MW	Mittelwert
NADPH-d	nicotinamid adenin dinucleotid phosphat diaphorase
NaOH	Natriumhydroxid
Nav1.8	voltage gated sodium channel
NBT	nitro-blue tetrazolium
NGS	Normal Goat Serum
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NL	Niederlande
nM	nano-Molar
nm	Nanometer
nNOS	konstitutive, neuronale NO Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptide Y
NRS	Normal Rabbit Serum
NRTN	Neurturin
ONOO ⁻	Peroxynitrit (NO ₃ ⁻)
p. a.	pro analysis
PBS	Phosphat gepufferte Saline (Salzlösung)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEP19	Peptide 19
PFA	Paraformaldehyd
PRV	Pseudorabiesvirus
PSPN	Persephin
PV	Parvalbumin

RANTES	regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RET	REarranged during Transfection
RT-PCR	Real Time-Polymerase-Ketten-Reaktion
Runx1	Runt-related transcription factor 1
s.o.	siehe oben
SDC	small dark cell
SEM	Standard Error of the Mean
SOM	Somatostatin
SP	Substanz P
SSC	Natriumcitrat-Salzlösung
SSEA3	globoseries glycoconjugate stage specific embryonic antigen 3
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEA	Triethanolamin
TG	Trigeminusganglion
TK	Thymidin-Kinase
TMP	Thiamin Monophosphatase
TNF	Tumornekrosefaktor
TrkA	high affinity receptor tyrosine kinase A
TrpV1	Vanilloid-Rezeptor 1
U	Unit
UK	United Kingdom
USA	United States of America
v.a.	vor allem
VG	Vestibularganglion
VIP	vasoactive intestinal polypeptide

vs.	versus
VZV	Varizella Zoster Virus
W	Weiblich
z.B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μm^2	Mikrometer im Quadrat

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Programmzeile des Computerprogramms Image J.....	33
Abbildung 2: Vermessung der Fläche eines Marker positiven Neurons.....	34
Abbildung 3: Ergebnisse der Vermessung des Neurons aus Abbildung 2.	34
Abbildung 4: Immunhistochemie zum Nachweis des Markers RET im humanen Ganglion trigeminale.....	38
Abbildung 5: Immunhistochemie zum Nachweis des Markers TrkA im humanen Ganglion trigeminale.....	38
Abbildung 6: Immunhistochemie zum Nachweis des Markers nNOS im humanen Ganglion trigeminale.....	39
Abbildung 7: In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von LAT+ Zellen im humanen Ganglion trigeminale.....	40
Abbildung 8: Weitere In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von LAT+ Zellen im humanen Ganglion trigeminale.	40
Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Doppelfärbung aus Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung für LAT und den Marker RET.	41
Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Doppelfärbung aus Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung für LAT und den Marker TrkA.....	42
Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Doppelfärbung aus Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung für LAT und den Marker nNOS.....	43
Abbildung 12: Diagrammdarstellung der prozentualen Verteilung der Kolo­kalisierung von LAT ± und RET ±	46
Abbildung 13: Diagrammdarstellung der prozentualen Verteilung der Kolo­kalisierung von LAT ± und TrkA ±.....	47
Abbildung 14: Diagrammdarstellung der prozentualen Verteilung der Kolo­kalisierung von LAT ± und nNOS ±.....	48
Abbildung 15: Boxplots zur Darstellung der Größe der einzelnen neuronalen Populationen und der vermessenen Neurone insgesamt im Vergleich.....	51
Abbildung 16: Boxplots zur Darstellung der Größen von LAT+ und LAT- Neuronen im Vergleich.....	53

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Einteilung und Charakteristika der humanpathogenen Herpesviren.....	3
Tabelle 2: Auflistung der Geräte.....	20
Tabelle 3: Auflistung der Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 4: Auflistung der Chemikalien	21
Tabelle 5: Auflistung der Puffer und Lösungen.....	22
Tabelle 6: Auflistung der Sonden und Nukleotide.....	23
Tabelle 7: Primäre Antikörper.....	24
Tabelle 8: Sekundäre Antikörper	24
Tabelle 9: Weitere Antikörper.....	25
Tabelle 10: Seren.....	25
Tabelle 11: Informationen zu den Spendern der Trigeminusganglien.....	37
Tabelle 12: Vier Felder Tafel zur Darstellung der prozentualen Einteilung der ausgezählten Neurone aus der Doppelfärbung für den Marker RET und LAT * ^p	46
Tabelle 13: Vier Felder Tafel zur Darstellung der prozentualen Einteilung der ausgezählten Neurone aus der Doppelfärbung für den Marker TrkA und LAT * ^p	47
Tabelle 14: Vier Felder Tafel zur Darstellung der prozentualen Einteilung der ausgezählten Neurone aus der Doppelfärbung für den Marker nNOS und LAT * ^p	48
Tabelle 15: Die ermittelten Werte der Größen für die neuronalen Populationen RET (RET+ im Vergleich zu RET-), TrkA (TrkA+ im Vergleich zu TrkA-) und nNOS (nNOS+ im Vergleich zu nNOS-). Ebenso die Werte der Größen für die Gesamtanzahl der vermessenen Neurone.....	50
Tabelle 16: Die ermittelten Werte der Größen für die LAT+ und LAT- Neurone im Vergleich.....	52

9 PUBLIKATIONEN

1.) PLoS One. 2013 Dec 19;8(12):e83603. doi: 10.1371/journal.pone.0083603

Characterization of Neuronal Populations in the Human Trigeminal Ganglion and Their Association with Latent Herpes Simplex Virus 1 Infection

Sarah E. Flowerdew*, **Desiree Wick***, Susanne Himmelein*, Anja K. E. Horn, Inga Sinicina, Michael Strupp, Thomas Brandt, Diethilde Theil, Katharina Hübner

*** These authors contributed equally to this work**

2.) J Neurovirol. 2012 Jun;18(3):172-80 (nicht in der Dissertation enthalten)

Immunohistochemical detection of intra-neuronal VZV proteins in snap-frozen human ganglia is confounded by antibodies directed against blood group A1-associated antigens

Werner J. D. Ouwendijk, Sarah E. Flowerdew, **Desiree Wick**, Anja K. E. Horn, Inga Sinicina, Michael Strupp, Albert D. M. E. Osterhaus, Georges M. G. M. Verjans, Katharina Hübner

10 LITERATURVERZEICHNIS

- Adler, H., J. L. Beland, N. C. Del-Pan, L. Kobzik, J. P. Brewer, T. R. Martin, and I. J. Rimm. 1997. 'Suppression of herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced pneumonia in mice by inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS, NOS2)', *J Exp Med*, 185: 1533-40.
- Ahmed, M., M. Lock, C. G. Miller, and N. W. Fraser. 2002. 'Regions of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo', *J Virol*, 76: 717-29.
- Aimi, Y., M. Fujimura, S. R. Vincent, and H. Kimura. 1991. 'Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat', *J Comp Neurol*, 306: 382-92.
- Airaksinen, M. S., and M. Saarma. 2002. 'The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value', *Nat Rev Neurosci*, 3: 383-94.
- Akaike, T., and H. Maeda. 2000. 'Nitric oxide and virus infection', *Immunology*, 101: 300-8.
- Apfel, S. C. 1999. 'Neurotrophic factors in peripheral neuropathies: therapeutic implications', *Brain Pathol*, 9: 393-413.
- Arbusow, V., T. Derfuss, K. Held, S. Himmelein, M. Strupp, R. Gurkov, T. Brandt, and D. Theil. 2010. 'Latency of herpes simplex virus type-1 in human geniculate and vestibular ganglia is associated with infiltration of CD8+ T cells', *J Med Virol*, 82: 1917-20.
- Arbusow, V., P. Schulz, M. Strupp, M. Dieterich, A. von Reinhardstoettner, E. Rauch, and T. Brandt. 1999. 'Distribution of herpes simplex virus type 1 in human geniculate and vestibular ganglia: implications for vestibular neuritis', *Ann Neurol*, 46: 416-9.
- Aurelius, E., B. Johansson, B. Skoldenberg, A. Staland, and M. Forsgren. 1991. 'Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid', *Lancet*, 337: 189-92.
- Averill, S., S. B. McMahon, D. O. Clary, L. F. Reichardt, and J. V. Priestley. 1995. 'Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons', *Eur J Neurosci*, 7: 1484-94.
- Barbacid, M. 1994. 'The Trk family of neurotrophin receptors', *J Neurobiol*, 25: 1386-403.
- Bennett, D. L., T. J. Boucher, M. P. Armanini, K. T. Poulsen, G. J. Michael, J. V. Priestley, H. S. Phillips, S. B. McMahon, and D. L. Shelton. 2000. 'The glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor components are differentially regulated within sensory neurons after nerve injury', *J Neurosci*, 20: 427-37.
- Bennett, D. L., G. J. Michael, N. Ramachandran, J. B. Munson, S. Averill, Q. Yan, S. B. McMahon, and J. V. Priestley. 1998. 'A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury', *J Neurosci*, 18: 3059-72.
- Bertke, A. S., S. M. Swanson, J. Chen, Y. Imai, P. R. Kinchington, and T. P. Margolis. 2011. 'A5-positive primary sensory neurons are nonpermissive for productive infection with herpes simplex virus 1 in vitro', *J Virol*, 85: 6669-77.
- Borsani, E., S. Giovannozzi, R. Boninsegna, R. Rezzani, M. Labanca, M. Tschabitscher, and L. F. Rodella. 2010. 'Nitroxidergic system in human trigeminal ganglia neurons: a quantitative evaluation', *Acta Histochem*, 112: 444-51.
- Boshoff, C., and R. Weiss. 2002. 'AIDS-related malignancies', *Nat Rev Cancer*, 2: 373-82.
- Bourane, S., A. Garces, S. Venteo, A. Pattyn, T. Hubert, A. Fichard, S. Puech, H. Boukhaddaoui, C. Baudet, S. Takahashi, J. Valmier, and P. Carroll. 2009. 'Low-

- threshold mechanoreceptor subtypes selectively express MafA and are specified by Ret signaling', *Neuron*, 64: 857-70.
- Braz, J. M., B. Rico, and A. I. Basbaum. 2002. 'Transneuronal tracing of diverse CNS circuits by Cre-mediated induction of wheat germ agglutinin in transgenic mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 15148-53.
- Chen, C. L., D. C. Broom, Y. Liu, J. C. de Nooij, Z. Li, C. Cen, O. A. Samad, T. M. Jessell, C. J. Woolf, and Q. Ma. 2006. 'Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain', *Neuron*, 49: 365-77.
- Chida, Y., and X. Mao. 2009. 'Does psychosocial stress predict symptomatic herpes simplex virus recurrence? A meta-analytic investigation on prospective studies', *Brain Behav Immun*, 23: 917-25.
- Clark, D. C. 2003. 'Common acute hand infections', *Am Fam Physician*, 68: 2167-76.
- Cliffe, A. R., J. H. Arbuckle, J. L. Vogel, M. J. Geden, S. B. Rothbart, C. L. Cusack, B. D. Strahl, T. M. Kristie, and M. Deshmukh. 2015. 'Neuronal Stress Pathway Mediating a Histone Methyl/Phospho Switch Is Required for Herpes Simplex Virus Reactivation', *Cell Host Microbe*, 18: 649-58.
- Corey, L. 1982. 'The diagnosis and treatment of genital herpes', *JAMA*, 248: 1041-9.
- Corey, L., H. G. Adams, Z. A. Brown, and K. K. Holmes. 1983. 'Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications', *Ann Intern Med*, 98: 958-72.
- Croen, K. D. 1993. 'Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication', *J Clin Invest*, 91: 2446-52.
- Derfuss, T., S. Segerer, S. Herberger, I. Sinicina, K. Hufner, K. Ebel, H. G. Knaus, I. Steiner, E. Meinel, K. Dornmair, V. Arbusow, M. Strupp, T. Brandt, and D. Theil. 2007. 'Presence of HSV-1 immediate early genes and clonally expanded T-cells with a memory effector phenotype in human trigeminal ganglia', *Brain Pathol*, 17: 389-98.
- Deshmane, S. L., and N. W. Fraser. 1989. 'During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure', *J Virol*, 63: 943-7.
- Dodd, J., and T. M. Jessell. 1985. 'Lactoseries carbohydrates specify subsets of dorsal root ganglion neurons projecting to the superficial dorsal horn of rat spinal cord', *J Neurosci*, 5: 3278-94.
- Dubner, R., and G. J. Bennett. 1983. 'Spinal and trigeminal mechanisms of nociception', *Annu Rev Neurosci*, 6: 381-418.
- Edvinsson, L., H. Mulder, P. J. Goadsby, and R. Uddman. 1998. 'Calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the trigeminal ganglion: cerebral vasodilatation from trigeminal nerve stimulation involves mainly calcitonin gene-related peptide', *J Auton Nerv Syst*, 70: 15-22.
- Ellermann-Eriksen, S. 2005. 'Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus', *Virology*, 2: 59.
- Ernsberger, U. 2008. 'The role of GDNF family ligand signalling in the differentiation of sympathetic and dorsal root ganglion neurons', *Cell Tissue Res*, 333: 353-71.
- Fang, X., L. Djouhri, S. McMullan, C. Berry, K. Okuse, S. G. Waxman, and S. N. Lawson. 2005. 'trkA is expressed in nociceptive neurons and influences electrophysiological properties via Nav1.8 expression in rapidly conducting nociceptors', *J Neurosci*, 25: 4868-78.
- Farooq, A. V., and D. Shukla. 2012. 'Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update', *Surv Ophthalmol*, 57: 448-62.
- Farrell, M. J., A. T. Dobson, and L. T. Feldman. 1991. 'Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 790-4.
- Feduchi, E., M. A. Alonso, and L. Carrasco. 1989. 'Human gamma interferon and tumor necrosis factor exert a synergistic blockade on the replication of herpes simplex virus', *J Virol*, 63: 1354-9.

-
- Feduchi, E., and L. Carrasco. 1991. 'Mechanism of inhibition of HSV-1 replication by tumor necrosis factor and interferon gamma', *Virology*, 180: 822-5.
- Feldman, L. T., A. R. Ellison, C. C. Voytek, L. Yang, P. Krause, and T. P. Margolis. 2002. 'Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 978-83.
- Flowerdew, S. E., D. Wick, S. Himmelein, A. K. Horn, I. Sinicina, M. Strupp, T. Brandt, D. Theil, and K. Hufner. 2013. 'Characterization of neuronal populations in the human trigeminal ganglion and their association with latent herpes simplex virus-1 infection', *PLoS One*, 8: e83603.
- Franck, M. C., A. Stenqvist, L. Li, J. Hao, D. Usoskin, X. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, and P. Ernfors. 2011. 'Essential role of Ret for defining non-peptidergic nociceptor phenotypes and functions in the adult mouse', *Eur J Neurosci*, 33: 1385-400.
- Frazier, D. P., D. Cox, E. M. Godshalk, and P. A. Schaffer. 1996. 'The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript promoter is activated through Ras and Raf by nerve growth factor and sodium butyrate in PC12 cells', *J Virol*, 70: 7424-32.
- Fujii, S., T. Akaike, and H. Maeda. 1999. 'Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats', *Virology*, 256: 203-12.
- Gaik, G. C., and A. I. Farbman. 1973. 'The chicken trigeminal ganglion. I. An anatomical analysis of the neuron types in the adult', *J Morphol*, 141: 43-55.
- Gamba, G., H. Cavalieri, M. C. Courreges, E. J. Massouh, and F. Benencia. 2004. 'Early inhibition of nitric oxide production increases HSV-1 intranasal infection', *J Med Virol*, 73: 313-22.
- Gasparsic, R., U. Kovacic, A. Cor, and U. Skaleric. 2007. 'Expression of TrkA receptor for neurotrophins in trigeminal neurons innervating the rat gingivomucosal tissue', *Neurosci Lett*, 418: 253-6.
- Gilden, D. H., R. J. Cohrs, and R. Mahalingam. 2003. 'Clinical and molecular pathogenesis of varicella virus infection', *Viral Immunol*, 16: 243-58.
- Goedert, M., U. Otten, S. P. Hunt, A. Bond, D. Chapman, M. Schlumpf, and W. Lichtensteiger. 1984. 'Biochemical and anatomical effects of antibodies against nerve growth factor on developing rat sensory ganglia', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 1580-4.
- Golden, J. P., M. Hoshi, M. A. Nassar, H. Enomoto, J. N. Wood, J. Milbrandt, R. W. Gereau, E. M. Johnson, Jr., and S. Jain. 2010. 'RET signaling is required for survival and normal function of nonpeptidergic nociceptors', *J Neurosci*, 30: 3983-94.
- Gottanka, J., W. Kirch, and E. R. Tamm. 2005. 'The origin of extrinsic nitrergic axons supplying the human eye', *J Anat*, 206: 225-9.
- Griffin, B. D., M. C. Verweij, and E. J. Wiertz. 2010. 'Herpesviruses and immunity: the art of evasion', *Vet Microbiol*, 143: 89-100.
- Grinde, B. 2013. 'Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response', *J Oral Microbiol*, 5.
- Gupta, A., J. J. Gartner, P. Sethupathy, A. G. Hatzigeorgiou, and N. W. Fraser. 2006. 'Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript', *Nature*, 442: 82-5.
- Hamza, M. A., D. M. Higgins, L. T. Feldman, and W. T. Ruyechan. 2007. 'The latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 promotes survival and stimulates axonal regeneration in sympathetic and trigeminal neurons', *J Neurovirol*, 13: 56-66.
- Hato, N., H. Kohno, H. Yamada, H. Takahashi, and K. Gyo. 2013. 'Role of Nitric Oxide in the Onset of Facial Nerve Palsy by HSV-1 Infection', *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 139: 1339-42.
- Haycock, J. W., and S. Bro. 1975. 'Corpus striatum (Translation of S. Ramon y Cajal). translated from Corps Strie, chapter 23, in "Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres" 1911', *Behav Biol*, 14: 387-402.

-
- Held, K., and T. Derfuss. 2011. 'Control of HSV-1 latency in human trigeminal ganglia--current overview', *J Neurovirol*, 17: 518-27.
- Held, K., A. Junker, K. Dornmair, E. Meinel, I. Sinicina, T. Brandt, D. Theil, and T. Derfuss. 2011. 'Expression of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs in human trigeminal ganglia and their relation to local T-cell infiltrates', *J Virol*, 85: 9680-5.
- Henderson, G., T. Jaber, D. Carpenter, S. L. Wechsler, and C. Jones. 2009. 'Identification of herpes simplex virus type 1 proteins encoded within the first 1.5 kb of the latency-associated transcript', *J Neurovirol*, 15: 439-48.
- Hilliges, M., J. Astback, L. Wang, K. Arvidson, and O. Johansson. 1996. 'Protein gene product 9.5-immunoreactive nerves and cells in human oral mucosa', *Anat Rec*, 245: 621-32.
- Hou, M., R. Uddman, J. Tajti, and L. Edvinsson. 2003. 'Nociceptin immunoreactivity and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion', *Brain Res*, 964: 179-86.
- Huang, E. J., G. A. Wilkinson, I. Farinas, C. Backus, K. Zang, S. L. Wong, and L. F. Reichardt. 1999. 'Expression of Trk receptors in the developing mouse trigeminal ganglion: in vivo evidence for NT-3 activation of TrkA and TrkB in addition to TrkC', *Development*, 126: 2191-203.
- Hufner, K., A. Horn, T. Derfuss, C. Glon, I. Sinicina, V. Arbusow, M. Strupp, T. Brandt, and D. Theil. 2009. 'Fewer latent herpes simplex virus type 1 and cytotoxic T cells occur in the ophthalmic division than in the maxillary and mandibular divisions of the human trigeminal ganglion and nerve', *J Virol*, 83: 3696-703.
- Jenkins, D. C., I. G. Charles, S. A. Baylis, R. Lelchuk, M. W. Radomski, and S. Moncada. 1994. 'Human colon cancer cell lines show a diverse pattern of nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide generation', *Br J Cancer*, 70: 847-9.
- Kai-Kai, M. A. 1989. 'Cytochemistry of the trigeminal and dorsal root ganglia and spinal cord of the rat', *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 93: 183-93.
- Karupiah, G., Q. W. Xie, R. M. Buller, C. Nathan, C. Duarte, and J. D. MacMicking. 1993. 'Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase', *Science*, 261: 1445-8.
- Kashiba, H., Y. Ueda, and E. Senba. 1996. 'Coexpression of preprotachykinin-A, alpha-calcitonin gene-related peptide, somatostatin, and neurotrophin receptor family messenger RNAs in rat dorsal root ganglion neurons', *Neuroscience*, 70: 179-89.
- Kent, J. R., W. Kang, C. G. Miller, and N. W. Fraser. 2003. 'Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function', *J Neurovirol*, 9: 285-90.
- Knickelbein, J. E., K. M. Khanna, M. B. Yee, C. J. Baty, P. R. Kinchington, and R. L. Hendricks. 2008. 'Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency', *Science*, 322: 268-71.
- Komatsu, T., Z. Bi, and C. S. Reiss. 1996. 'Interferon-gamma induced type I nitric oxide synthase activity inhibits viral replication in neurons', *J Neuroimmunol*, 68: 101-8.
- Komatsu, T., D. D. Ireland, N. Chen, and C. S. Reiss. 1999. 'Neuronal expression of NOS-1 is required for host recovery from viral encephalitis', *Virology*, 258: 389-95.
- Komatsu, T., N. Srivastava, M. Revzin, D. D. Ireland, D. Chesler, and C. S. Reiss. 1999. 'Mechanisms of cytokine-mediated inhibition of viral replication', *Virology*, 259: 334-41.
- Kramer, M. F., and D. M. Coen. 1995. 'Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus', *J Virol*, 69: 1389-99.
- Lawson, S. N., B. A. Crepps, and E. R. Perl. 1997. 'Relationship of substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in guinea-pig', *J Physiol*, 505 (Pt 1): 177-91.

-
- Lawson, S. N., B. Crepps, and E. R. Perl. 2002. 'Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and afferent receptive properties of dorsal root ganglion neurones in guinea-pigs', *J Physiol*, 540: 989-1002.
- Lazarov, N., and A. Dandov. 1998. 'Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in the trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus of the cat. A histochemical and immunohistochemical study', *Acta Anat (Basel)*, 163: 191-200.
- Lazarov, N. E. 2002. 'Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus', *Prog Neurobiol*, 66: 19-59.
- Leininger, G. M., A. M. Vincent, and E. L. Feldman. 2004. 'The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy', *J Peripher Nerv Syst*, 9: 26-53.
- Lewin, G. R., and Y. A. Barde. 1996. 'Physiology of the neurotrophins', *Annu Rev Neurosci*, 19: 289-317.
- Lewis, M. A. 2004. 'Herpes simplex virus: an occupational hazard in dentistry', *Int Dent J*, 54: 103-11.
- Liu, T., K. M. Khanna, B. N. Carriere, and R. L. Hendricks. 2001. 'Gamma interferon can prevent herpes simplex virus type 1 reactivation from latency in sensory neurons', *J Virol*, 75: 11178-84.
- Liu, T., K. M. Khanna, X. Chen, D. J. Fink, and R. L. Hendricks. 2000. 'CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons', *J Exp Med*, 191: 1459-66.
- Luo, W., H. Enomoto, F. L. Rice, J. Milbrandt, and D. D. Ginty. 2009. 'Molecular identification of rapidly adapting mechanoreceptors and their developmental dependence on ret signaling', *Neuron*, 64: 841-56.
- Luo, W., S. R. Wickramasinghe, J. M. Savitt, J. W. Griffin, T. M. Dawson, and D. D. Ginty. 2007. 'A hierarchical NGF signaling cascade controls Ret-dependent and Ret-independent events during development of nonpeptidergic DRG neurons', *Neuron*, 54: 739-54.
- MacLean, A., X. Q. Wei, F. P. Huang, U. A. Al-Alem, W. L. Chan, and F. Y. Liew. 1998. 'Mice lacking inducible nitric-oxide synthase are more susceptible to herpes simplex virus infection despite enhanced Th1 cell responses', *J Gen Virol*, 79 (Pt 4): 825-30.
- Maillet, S., T. Naas, S. Crepin, A. M. Roque-Afonso, F. Lafay, S. Efstathiou, and M. Labetoulle. 2006. 'Herpes simplex virus type 1 latently infected neurons differentially express latency-associated and ICP0 transcripts', *J Virol*, 80: 9310-21.
- Malick, A., and R. Burstein. 2000. 'Peripheral and central sensitization during migraine', *Funct Neurol*, 15 Suppl 3: 28-35.
- Malin, S. A., and B. M. Davis. 2008. 'Postnatal roles of glial cell line-derived neurotrophic factor family members in nociceptors plasticity', *Sheng Li Xue Bao*, 60: 571-8.
- Marcaccini, A., M. Lopez-Pena, R. Bermudez, M. I. Quiroga, F. H. Guerrero, J. M. Nieto, and N. Aleman. 2007. 'Pseudorabies virus induces a rapid up-regulation of nitric oxide synthases in the nervous system of swine', *Vet Microbiol*, 125: 232-43.
- Marfurt, C. F. 1981. 'The somatotopic organization of the cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique', *Anat Rec*, 201: 105-18.
- Margolis, T. P., Y. Imai, L. Yang, V. Vallas, and P. R. Krause. 2007. 'Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) establishes latent infection in a different population of ganglionic neurons than HSV-1: role of latency-associated transcripts', *J Virol*, 81: 1872-8.
- Margolis, T. P., F. Sedarati, A. T. Dobson, L. T. Feldman, and J. G. Stevens. 1992. 'Pathways of viral gene expression during acute neuronal infection with HSV-1', *Virology*, 189: 150-60.

-
- Marmigere, F., and P. Ernfors. 2007. 'Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage', *Nat Rev Neurosci*, 8: 114-27.
- Marmigere, F., A. Montelius, M. Wegner, Y. Groner, L. F. Reichardt, and P. Ernfors. 2006. 'The Runx1/AML1 transcription factor selectively regulates development and survival of TrkA nociceptive sensory neurons', *Nat Neurosci*, 9: 180-7.
- Mendell, L. M. 1999. 'Neurotrophin action on sensory neurons in adults: an extension of the neurotrophic hypothesis', *Pain*, Suppl 6: S127-32.
- Meyding-Lamade, U., S. Seyfer, J. Haas, F. Dvorak, R. Kehm, W. Lamade, W. Hacke, and B. Wildemann. 2002. 'Experimental herpes simplex virus encephalitis: inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in mouse brain tissue', *Neurosci Lett*, 318: 21-4.
- Modrow S., Falke D., Truyen U. 2003. *Molekulare Virologie* (Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl.).
- Molliver, D. C., and W. D. Snider. 1997. 'Nerve growth factor receptor TrkA is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons', *J Comp Neurol*, 381: 428-38.
- Molliver, D. C., D. E. Wright, M. L. Leitner, A. S. Parsadanian, K. Doster, D. Wen, Q. Yan, and W. D. Snider. 1997. 'IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life', *Neuron*, 19: 849-61.
- Naraqi, S., G. G. Jackson, O. Jonasson, and H. M. Yamashiroya. 1977. 'Prospective study of prevalence, incidence, and source of herpesvirus infections in patients with renal allografts', *J Infect Dis*, 136: 531-40.
- Nicoll, M. P., W. Hann, M. Shivkumar, L. E. Harman, V. Connor, H. M. Coleman, J. T. Proenca, and S. Efsthathiou. 2016. 'The HSV-1 Latency-Associated Transcript Functions to Repress Latent Phase Lytic Gene Expression and Suppress Virus Reactivation from Latently Infected Neurons', *PLoS Pathog*, 12: e1005539.
- Nozaki, K., M. A. Moskowitz, K. I. Maynard, N. Koketsu, T. M. Dawson, D. S. Bredt, and S. H. Snyder. 1993. 'Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries', *J Cereb Blood Flow Metab*, 13: 70-9.
- Perng, G. C., E. C. Dunkel, P. A. Geary, S. M. Slanina, H. Ghiasi, R. Kaiwar, A. B. Nesburn, and S. L. Wechsler. 1994. 'The latency-associated transcript gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is required for efficient in vivo spontaneous reactivation of HSV-1 from latency', *J Virol*, 68: 8045-55.
- Perng, G. C., C. Jones, J. Ciacci-Zanella, M. Stone, G. Henderson, A. Yukht, S. M. Slanina, F. M. Hofman, H. Ghiasi, A. B. Nesburn, and S. L. Wechsler. 2000. 'Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript', *Science*, 287: 1500-3.
- Perng, G. C., S. M. Slanina, A. Yukht, H. Ghiasi, A. B. Nesburn, and S. L. Wechsler. 2000. 'The latency-associated transcript gene enhances establishment of herpes simplex virus type 1 latency in rabbits', *J Virol*, 74: 1885-91.
- Pezet, S., and S. B. McMahon. 2006. 'Neurotrophins: mediators and modulators of pain', *Annu Rev Neurosci*, 29: 507-38.
- Preston, C. M. 2000. 'Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency', *J Gen Virol*, 81: 1-19.
- Quartu, M., M. Geic, and M. Del Fiacco. 1997. 'Neurotrophin-like immunoreactivity in the human trigeminal ganglion', *Neuroreport*, 8: 3611-7.
- Quartu, M., M. P. Serra, F. Mascia, M. Boi, M. L. Lai, A. Spano, and M. Del Fiacco. 2006. 'GDNF family ligand receptor components Ret and GFRalpha-1 in the human trigeminal ganglion and sensory nuclei', *Brain Res Bull*, 69: 393-403.
- Quartu, M., M. D. Setzu, and M. Del Fiacco. 1996. 'trk-like immunoreactivity in the human trigeminal ganglion and subnucleus caudalis', *Neuroreport*, 7: 1013-9.
- Ramachandran, R., K. B. Ploug, A. Hay-Schmidt, J. Olesen, I. Jansen-Olesen, and S. Gupta. 2010. 'Nitric oxide synthase (NOS) in the trigeminal vascular system and other brain structures related to pain in rats', *Neurosci Lett*, 484: 192-6.

-
- Ramer, M. S., J. V. Priestley, and S. B. McMahon. 2000. 'Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord', *Nature*, 403: 312-6.
- Reiss, C. S., and T. Komatsu. 1998. 'Does nitric oxide play a critical role in viral infections?', *J Virol*, 72: 4547-51.
- Rozenberg, F., C. Deback, and H. Agut. 2011. 'Herpes simplex encephalitis : from virus to therapy', *Infect Disord Drug Targets*, 11: 235-50.
- Runeberg-Roos, P., and M. Saarma. 2007. 'Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases', *Ann Med*, 39: 572-80.
- Ryder, M. I., W. Nittayananta, M. Coogan, D. Greenspan, and J. S. Greenspan. 2012. 'Periodontal disease in HIV/AIDS', *Periodontol 2000*, 60: 78-97.
- Sawtell, N. M. 1997. 'Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level', *J Virol*, 71: 5423-31.
- Scherrer, G., N. Imamachi, Y. Q. Cao, C. Contet, F. Mennicken, D. O'Donnell, B. L. Kieffer, and A. I. Basbaum. 2009. 'Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain', *Cell*, 137: 1148-59.
- Schuman, E. M., and D. V. Madison. 1991. 'A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation', *Science*, 254: 1503-6.
- Serrano, F., L. W. Enquist, and J. P. Card. 2002. 'Pseudorabies virus-induced expression of nitric oxide synthase isoforms', *Physiol Behav*, 77: 557-63.
- Sheridan, B. S., J. E. Knickelbein, and R. L. Hendricks. 2007. 'CD8 T cells and latent herpes simplex virus type 1: keeping the peace in sensory ganglia', *Expert Opin Biol Ther*, 7: 1323-31.
- Shu, M., T. Du, G. Zhou, and B. Roizman. 2015. 'Role of activating transcription factor 3 in the synthesis of latency-associated transcript and maintenance of herpes simplex virus 1 in latent state in ganglia', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: E5420-6.
- Smith, J. S., and N. J. Robinson. 2002. 'Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review', *J Infect Dis*, 186 Suppl 1: S3-28.
- Smith, R. L., L. I. Pizer, E. M. Johnson, Jr., and C. L. Wilcox. 1992. 'Activation of second-messenger pathways reactivates latent herpes simplex virus in neuronal cultures', *Virology*, 188: 311-8.
- Snider, W. D., and S. B. McMahon. 1998. 'Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors', *Neuron*, 20: 629-32.
- Sniderhan, L. F., T. M. Garcia-Bates, M. Burgart, S. H. Bernstein, R. P. Phipps, and S. B. Maggiora. 2009. 'Neurotrophin signaling through tropomyosin receptor kinases contributes to survival and proliferation of non-Hodgkin lymphoma', *Exp Hematol*, 37: 1295-309.
- Snyder, S. H. 1992. 'Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters', *Science*, 257: 494-6.
- Sommer, E. W., J. Kazimierzczak, and B. Droz. 1985. 'Neuronal subpopulations in the dorsal root ganglion of the mouse as characterized by combination of ultrastructural and cytochemical features', *Brain Res*, 346: 310-26.
- Steiner, I., and P. G. Kennedy. 1995. 'Herpes simplex virus latent infection in the nervous system', *J Neurovirol*, 1: 19-29.
- Steiner, I., P. G. Kennedy, and A. R. Pachner. 2007. 'The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster', *Lancet Neurol*, 6: 1015-28.
- Stevens, J. G., and M. L. Cook. 1971. 'Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice', *Science*, 173: 843-5.
- Stoyanova, I., and N. E. Lazarov. 2005. 'Localization of nitric oxide synthase in rat trigeminal primary afferent neurons using NADPH-diaphorase histochemistry', *J Mol Histol*, 36: 187-93.
- Sugimoto, T., M. Takemura, A. Sakai, and M. Ishimaru. 1986. 'Cell size analysis of trigeminal primary afferent neurons comprising individual peripheral branches of the rat mandibular nerve', *Exp Neurol*, 93: 565-73.

-
- Tajti, J., R. Uddman, S. Moller, F. Sundler, and L. Edvinsson. 1999. 'Messenger molecules and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion', *J Auton Nerv Syst*, 76: 176-83.
- Terenghi, G., V. Riveros-Moreno, L. D. Hudson, N. B. Ibrahim, and J. M. Polak. 1993. 'Immunohistochemistry of nitric oxide synthase demonstrates immunoreactive neurons in spinal cord and dorsal root ganglia of man and rat', *J Neurol Sci*, 118: 34-7.
- Theil, D., V. Arbusow, T. Derfuss, M. Strupp, M. Pfeiffer, A. Mascolo, and T. Brandt. 2001. 'Prevalence of HSV-1 LAT in human trigeminal, geniculate, and vestibular ganglia and its implication for cranial nerve syndromes', *Brain Pathol*, 11: 408-13.
- Theil, D., T. Derfuss, I. Paripovic, S. Herberger, E. Meinl, O. Schueler, M. Strupp, V. Arbusow, and T. Brandt. 2003. 'Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response', *Am J Pathol*, 163: 2179-84.
- Theil, D., T. Derfuss, M. Strupp, D. H. Gilden, V. Arbusow, and T. Brandt. 2002. 'Cranial nerve palsies: herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency', *Ann Neurol*, 51: 273-4.
- Thompson, R. L., and N. M. Sawtell. 1997. 'The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency', *J Virol*, 71: 5432-40.
- Townsend, C. L., M. Forsgren, K. Ahlfors, S. A. Ivarsson, P. A. Tookey, and C. S. Peckham. 2013. 'Long-term outcomes of congenital cytomegalovirus infection in Sweden and the United Kingdom', *Clin Infect Dis*, 56: 1232-9.
- Umene, K., and H. Sakaoka. 1999. 'Evolution of herpes simplex virus type 1 under herpesviral evolutionary processes', *Arch Virol*, 144: 637-56.
- Wagner, E. K., and D. C. Bloom. 1997. 'Experimental investigation of herpes simplex virus latency', *Clin Microbiol Rev*, 10: 419-43.
- Wang, K., T. Y. Lau, M. Morales, E. K. Mont, and S. E. Straus. 2005. 'Laser-capture microdissection: refining estimates of the quantity and distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus DNA in human trigeminal Ganglia at the single-cell level', *J Virol*, 79: 14079-87.
- Wauters, O., E. Lebas, and A. F. Nikkels. 2012. 'Chronic mucocutaneous herpes simplex virus and varicella zoster virus infections', *J Am Acad Dermatol*, 66: e217-27.
- Wetmore, C., and L. Olson. 1995. 'Neuronal and nonneuronal expression of neurotrophins and their receptors in sensory and sympathetic ganglia suggest new intercellular trophic interactions', *J Comp Neurol*, 353: 143-59.
- Whitley, R. J., D. W. Kimberlin, and B. Roizman. 1998. 'Herpes simplex viruses', *Clin Infect Dis*, 26: 541-53; quiz 54-5.
- Wiesmann, C., and A. M. de Vos. 2001. 'Nerve growth factor: structure and function', *Cell Mol Life Sci*, 58: 748-59.
- Wilson, A. C., and I. Mohr. 2012. 'A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons', *Trends Microbiol*, 20: 604-11.
- Woolf, C. J., and Q. Ma. 2007. 'Nociceptors--noxious stimulus detectors', *Neuron*, 55: 353-64.
- Wutzler, P., H. W. Doerr, I. Farber, U. Eichhorn, B. Helbig, A. Sauerbrei, A. Brandstadt, and H. F. Rabenau. 2000. 'Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected German populations-relevance for the incidence of genital herpes', *J Med Virol*, 61: 201-7.
- Yang, L., C. C. Voytek, and T. P. Margolis. 2000. 'Immunohistochemical analysis of primary sensory neurons latently infected with herpes simplex virus type 1', *J Virol*, 74: 209-17.
- Zaki, M. H., T. Akuta, and T. Akaike. 2005. 'Nitric oxide-induced nitrative stress involved in microbial pathogenesis', *J Pharmacol Sci*, 98: 117-29.
- Zerr, D. M., A. S. Meier, S. S. Selke, L. M. Frenkel, M. L. Huang, A. Wald, M. P. Rhoads, L. Nguy, R. Bornemann, R. A. Morrow, and L. Corey. 2005. 'A

-
- population-based study of primary human herpesvirus 6 infection', *N Engl J Med*, 352: 768-76.
- Zylka, M. J., F. L. Rice, and D. J. Anderson. 2005. 'Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd', *Neuron*, 45: 17-25.

11 DANKSAGUNG

Ich möchte mich für die sehr gute Betreuung im Rahmen meiner Dissertation bedanken. Hier gilt mein besonderer Dank meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Katharina Hübner. Zudem ein herzliches Dankeschön für die Unterstützung an Frau Dr. phil. S. Flowerdew und Frau Dr. rer. nat. S. Himmelein.

Auch ein herzliches Dankeschön an meine Freundinnen Marina Wetzel, Verena Willige und Bettina Engel.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglicht haben.

Mein allergrößter Dank geht an meinen Ehemann, meine Schwester und meine Mama, die mich stets gestärkt haben und mir zu jeder Zeit den Rücken freigehalten haben.

Eidesstattliche Versicherung

Zörgiebel-Wick, Desiree

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Charakterisierung neuronaler Populationen des humanen Ganglion Trigeminale und deren Assoziation mit der latenten Herpes Simplex Virus Typ 1 Infektion

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 10.05.2018

Ort, Datum

Desiree Zörgiebel-Wick

Unterschrift Doktorandin/Doktorand